

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL**



**ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN DE FLUORENO BAJO
CONDICIONES NITRATO-REDUCTORAS CON UN CONSORCIO
MICROBIANO FACULTATIVO ACLIMATADO A DIÉSEL**

POR

ING. CARLOS MACÍAS SOTELO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

OCTUBRE 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL**

DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN DE FLUORENO BAJO
CONDICIONES NITRATO-REDUCTORAS CON UN CONSORCIO
MICROBIANO FACULTATIVO ACLIMATADO A DIÉSEL**

POR

ING. CARLOS MACÍAS SOTELO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

OCTUBRE, 2017

Dedicatoria

Después de este camino recorrido tengo que agradecer a mis padres Sr. Ismael Macías Hernández y Sra. Efigenia Sotelo Miranda, por haber tomado la decisión de emigrar a otra ciudad que ofreció no solo sustento sino también una formación académica para mí y mis hermanas, además de amistades y una perspectiva al cambio constante que ha influido hoy en día y seguirá influyendo lo que reste de vida; este trabajo es dedicado a ustedes.

Agradecimientos

Al Dr. Santiago Iván Suárez Vázquez por ser mi asesor, amigo y por darme la orientación requerida en su momento y por alentarme a superar todos los días las dificultades que travesamos en esta travesía.

Al Dr. Karim Acuña Askar que con su experiencia y paciencia hicieron posible este extenso.

Al Dr. J. Ballesteros Pacheco por haber inculcado en mí las nociones de la investigación y darme una oportunidad de crecer académicamente e impulsar mis expectativas de crecimiento.

Al Sr. Marco A. E. López Bejarano por darme una oportunidad de formarme en los negocios y contar no solo con su apoyo sino también de su familia y amigos desde hace más de 10 años.

Al M.C. Gerardo Ortiz Rodríguez por darme la formación previa a este proyecto y enseñarme que la rectitud te marca durante toda tu carrera.

A la M.I. Yareni Navarro López por estos años compartidos por darme esa oportunidad de compartir contigo estos logros, fracasos y sobre todo lo que nos une gracias.

Al Dr. Arquímedes Cruz López por ese apoyo que me brindó hasta el final de este proyecto, siempre estaré no solo agradecido sino en deuda.

A la Maestra Lirio M. Reyna por su amistad y apoyo que contribuyeron en gran medida en las etapas experimentales de este proyecto.

A mi compadre y amigo Earvig Arciga Duran quien me alentó a dar este paso e influir para mejorar académicamente desde siempre...

A los negros que siempre han estado ahí con el transcurso de estos años, amigos gracias por estar aquí tener el honor de brindarme su amistad hermanos.

A todos mis amigos compañeros que sin querer han influido positivamente desde siempre gracias.

A su vez a los proyectos que brindaron el financiamiento de esta tesis y proyecto: PROMEP Nuevo PTC DSA/103.5/16/10510, PAICYT IT 510-10, PAIFIC/2015-15

No menos importante al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada número 585417 para la realización de este proyecto y tesis de maestría.

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos Policíclicos son contaminantes derivados del petróleo o generados por la combustión de baja temperatura de compuestos orgánicos, se ha reportado la presencia de estos compuestos en aire, suelo y agua siendo este último el que presenta un mayor reto al momento de su eliminación, ya que la solubilidad de los HAPs es muy baja; la importancia de su eliminación de los ecosistemas se ha priorizado en los últimos años la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ha establecido una lista de estos compuestos ya que se ha demostrado que son bioacumulables en los seres vivos además de ser asociados con ser cancerígenos y mutagénicos.

Una alternativa para la eliminación de estos contaminantes es la implementación de consorcios de especies microbianas bajo condiciones controladas, este estudio se centra en la eliminación del fluoreno empleando un consorcio aclimatado a diésel y condiciones nitrato-reductoras bajo dos condiciones experimentales, reactores *batch* y un reactor de flujo ascendente, además de la adición de un surfactante comercial (GAELE) como dispersante; en el estudio en *batch* se determinó la biodegradación de 200 mg.L⁻¹ de fluoreno, logrando hasta un 99 % de biodegradación a los 60 días y la determinación de la constante cinética a partir del modelo de primer orden.

Por otra parte el estudio en el reactor de flujo ascendente se desarrolló empleando las concentraciones de 100, 150, 200, 250, 300, 350 mg.L⁻¹, aplicando dos tiempos de retención hidráulicos 0.75 y 1.25 h logrando en ambos hasta un 95 % de biodegradación del fluoreno a su vez se determinaron las constantes cinéticas a partir de los modelos bifásico y Arvin, para finalmente determinar las curvas hiperbólicas de monod, obteniendo que las constantes de saturación media para el TRH de 0.75 y 1.25 h son 83.03 y 687.03 mg.L⁻¹ respectivamente.

Índice

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos	II
Resumen.....	III
Índice de tablas.....	VII
Índice de figuras.....	VIII
Índice de ecuaciones.....	IX
Lista de abreviaturas	X
Capítulo 1 Generalidades y Objetivos	1
1.1 Introducción.....	2
1.1.1 Principales fuentes de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs).....	4
1.1.2 Recuperación y manejo de hidrocarburos en derrames	6
1.1.3 Biodegradación alternativa para remediar la contaminación de hidrocarburos	7
1.2 Justificación	8
1.3 Hipótesis	9
1.4 Objetivos.....	9
1.4.1 Objetivo general	9
1.4.2 Objetivos específicos	10
Capítulo 2 Antecedentes	11
2.1 Hidrocarburos.....	12
2.1.1 Principales vectores energéticos	12
2.1.2 Los hidrocarburos y el medio ambiente	16
2.1.2.1 El derrame de hidrocarburos a nivel global y en México	16
2.1.3 Alternativas de remediación de hidrocarburos.....	21
2.2 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) y fuentes de emisión	25
2.2.1 Clasificación de los HAPs de la USEPA	26
2.2.2 Toxicidad y repercusiones del fluoreno en la salud.	27
2.2.3 Tratamientos de remediación de sitios contaminados con HAPs	28
2.2.3.1 Microorganismos asociados con la biodegradación de compuestos aromáticos policíclicos.....	29
2.2.3.2 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs	31
2.2.3.3 Condiciones nitrato-reductoras en la biodegradación de hidrocarburos	31

2.2.3.4 Adición de surfactantes y sus efectos	34
2.2.3.5 Modelos cinéticos de biodegradación.....	35
2.2.3.5.1 Modelo cinético de Monod y su aplicación ambiental	36
2.2.3.5.2 Los modelos cinéticos de Arvin, bifásico y su aplicación ambiental	37
2.2.3.6 Mecanismo de biodegradación anaerobia de fluoreno	38
2.2.3.7 Consideraciones generales en reactores de biopelículas.....	40
Capítulo 3 Metodología Experimental.....	42
3.1 Introducción al desarrollo experimental: Perspectiva General.....	43
3.2 Determinación de la concentración micelar critica (CMC) del GAELE.....	44
3.3 Medio de cultivo nitrato reductor	45
3.4 Obtención del consorcio microbiano	46
3.5 Evaluación de parámetros	47
3.5.1 Tiempo de Retención Hidráulico (TRH)	47
3.5.2 Potencial Óxido Reducción (ORP) y pH.....	48
3.5.3 Oxígeno Disuelto (OD).....	48
3.5.4 Asimilación de nitratos	48
3.5.5 Determinación de la masa celular volátil reactores <i>batch</i>	50
3.5.6 Determinación de la masa celular volátil y espesor de la biopelícula en el RFA	52
3.5.6 Determinación de la biodegradación en los reactores <i>batch</i>	54
3.5.7 Determinación de la biodegradación en el RFA	56
3.5.7.1 Montaje y operación del RFA	56
3.5.7.2 Determinación de biodegradación en RFA y sus condiciones	57
3.5.7.3 Determinación de DQO y DBO ₅	57
3.5.8 Cálculo de las constantes cinéticas reactores <i>batch</i>	58
3.5.9 Cálculo de las constantes cinéticas RFA.....	59
3.5.10 Cálculos termodinámicos	61
Capítulo 4 Resultados y discusiones.....	63
4.1 Concentración micelar critica (CMC) del GAELE.....	64
4.2 Ensayos en reactores <i>batch</i>	65
4.2.1 Mediciones ORP, pH, OD y Temperatura.....	65
4.2.2 Asimilación de nitratos	67

4.2.3 MCV en reactores batch	67
4.2.4 Estudio de biodegradación en reactores batch.....	68
4.2.5 Constate de biodegradación batch	70
4.3 Ensayos en RFA	72
4.3.1 Mediciones ORP, pH, OD y Temperatura.....	72
4.3.2 Asimilación de nitratos RFA.....	73
4.3.3 Resultados de DQO y DBO ₅ RFA.....	74
4.3.4 Resultados de MCV en el reactor RFA.....	75
4.3.5 Estudio de biodegradación en RFA.....	77
4.3.6 Constantes de biodegradación RFA.....	78
Capítulo 5 Conclusiones y recomendaciones	86
Capítulo 6 Referencias.....	89

Índice de tablas

Tabla 2.1 Compuestos que conforma la lista de los 16 HAPs de la Agencia de Protección Ambiental (USEPA)	27
Tabla 2.2 Microorganismos asociados a la biodegradación de HAPs.	30
Tabla 3.1 Medio nitrato-reductor	45
Tabla 3.2 Composición stock de nutrientes.....	46
Tabla 4.1 Resultados de la medición de parámetros batch.....	66
Tabla 4.2 Resultados de la reducción de nitratos para los reactores batch.....	67
Tabla 4.3 Resultados de biodegradación de 200 mg.L ⁻¹ fluoreno ensayos batch	70
Tabla 4.44 Comparativo de constantes de biodegradación y sus condiciones.....	71
Tabla 4.5 Parámetros de medición RFA	72
Tabla 4.6 Resultados de la prueba de reducción de nitratos para el reactor de flujo ascendente	73
Tabla 4.7 Resultados DQO Y DBO5 en la nitrato-reducción de fluoreno reactor de flujo ascendente ..	74
Tabla 4.8 Porcentajes de remoción de DQO Y DBO5 en la nitrato-reducción de fluoreno reactor de flujo ascendente	75
Tabla 4.9 Concentración de biomasa, área superficial y grosor de biopelícula por segmento RFA.....	76
Tabla 4.10 Resultados de biodegradación del fluoreno RFA.....	77
Tabla 4.11 Constantes cinéticas de los modelos de doble fase y Arvin.	79
Tabla 4.12 Constantes cinéticas de saturación del Modelo de Monod	82
Tabla 4.13 Coeficientes de conversión cinética de la actividad bacteriana	84

Índice de figuras

Figura 1.1 Gráfico de derrames de las últimas cinco décadas. Fuente: International Association of Oil & Gas Producers 2015 [3]	2
Figura 1.2 Estructura molecular del fluoreno	6
Figura 2.1 Componentes del gas natural seco y líquidos del gas húmedo	13
Figura 2.2 Proceso de refinación de petróleo y principales productos	15
Figura 2.3 Compuestos presentes en los derivados del petróleo	15
Figura 2.4 Distribución de las instalaciones de la industria petroquímica en México Anuario Pemex 2014 [53]	18
Figura 2.5 Volumen de derrame de petróleo crudo y volumen de gas natural por estados del 2000-2014 Fuente: CNH [54].....	19
Figura 2.6 Derrames de Hidrocarburos cuantificados y no cuantificados, Volúmen Derramado por estados y Volúmen Derramado en Tierra y Mar del 2000-2014 Fuente CNH [54]	20
Figura 2.7 Principales fuentes de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	26
Figura 2.8 Diferentes estados de oxidación del Nitrógeno	32
Figura 2.9 Ciclo del nitrógeno. 1a asimilación de amonio, 1b asimilación de nitrato, 2 amonificación: mineralización, 3 de fijación, 4 nitrificación desnitrificación 5, 6 reducción de DRNA disimilativo nitrato de amonio, 7 anammox: anaerobia Oxidación del amonio Fuente: Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications [85].	33
Figura 2.10 a) Monómeros de surfactantes, b) Micela del surfactante	35
Figura 2.11 Proceso simplificado de la biotransformación de HAPs durante el mecanismo anaerobio Fuente: Shalini Gupta [106].	39
Figura 2.12 Diferentes rutas de descomposición de fluoreno por biodegradación anaerobia. .	40
Figura 3.1 a) Reactor de flujo ascendente b) Bomba peristáltica c) Placa de agitación y matraz con medio de cultivo.	56
Figura 4.1 a) Comportamiento de la adición de 0 a 10,000 ppm de GAELE b) Comportamiento de la adición de 0 a 2000 ppm de GAELE	65
Figura 4.2 Patrón de biodegradación de fluoreno en reactores batch a una $C_0 = 200 \text{ mg.L}^{-1}$..	68
Figura 4.3 Patrón de biodegradación de fluoreno utilizando el modelo bifásico a)TRH 0.75 h b) TRH 1.25 h	78
Figura 4.4 Comportamiento de las constantes de biodegradación modelo bifásico a) TRH 0.75 h b) TRH 1.25 h	80
Figura 4.5 Tasas máximas de utilización a) TRH 0.75 h b)TRH 1.25 h	81
Figura 4.6 Curvas de saturación hiperbólicas de Monod TRH 0.75 y 1.25 h	82

Figura 4.7 Gráficos del comportamiento del coeficiente de actividad bacteriana media a) TRH 0.75 h b) TRH 1.25 h	83
--	----

Índice de ecuaciones

Ecuación 2.1 Modelo cinético de Monod	36
Ecuación 2.2 Modelo bifásico	37
Ecuación 2.3 Modelo cinético de Arvin [105]	38
Ecuación 3.1 Determinación de la Densidad ρ (gr/cm ³)	44
Ecuación 3.2 Determinación del cambio de la tensión superficial de un fluido (dina/cm)	45
Ecuación 3.3 Determinación de la masa celular volátil.....	51
Ecuación 3.4 Determinación de masa celular volátil RFA.	53
Ecuación 3.5 Determinación del grosor de biopelícula RFA.....	53
Ecuación 3.6 Modelo cinético de primer orden.....	58
Ecuación 3.7 Modelo bifásico	59
Ecuación 3.8 Modelo cinético de Arvin [105].....	60
Ecuación 3.9 Modelo cinético de Monod	60
Ecuación 3.10 Energía libre de Gibbs estándar	61
Ecuación 3.11 Balance estequiométrico de la mineralización del fluoreno bajo condiciones nitrato-reductoras	62

Lista de abreviaturas

CMC	Concentración Micelar Critica
CNH	Comisión Nacional de Hidrocarburos
DBO₅	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EUA	Estados Unidos de Norte América *
FID	Detector de Ionización de Flama *
GAELE	Ácido Glicolico Etoxilato Lauril Eter *
HA	Hidrocarburo Alifático
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
MCB	Matriz de Bambú Modificada
MCV	Masa Celular Volátil
N	Nitrógeno
NH	Amoniacó
NO₃	Ion Nitrato
NRP	Nitrato Reductasa Periplásmica
OD	Oxígeno Disuelto
ONU	Organización Mundial de las Naciones Unidas *
ORP	Potencial Óxido Reducción*
PEMEX	Petróleos Mexicanos
RFA	Reactor de Flujo Ascendente
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SSV	Solidos Suspendidos Volátiles

TC	Toma Clandestina
TEMP	Temperatura
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico
	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norte
USEPA	América *
	<i>* Por sus siglas en ingles</i>

Capítulo 1 Generalidades y Objetivos

1.1 Introducción

El uso industrializado y exorbitado de enormes cantidades de productos derivados del petróleo contribuye en gran medida a la contaminación del aire, del suelo y del agua, tanto subterránea como superficial. Hoy en día, la contaminación ambiental por hidrocarburos es de gran preocupación, debido a los impactos negativos que éstos ejercen en el medio ambiente y en la salud [1]. En particular, se ha reportado que el crudo y sus derivados contaminan los ambientes marinos tanto de forma natural, como por el resultado de actividades antropogénicas. Dentro de los peores derrames en la historia, relacionados con la extracción del crudo, se encuentra el derrame del barco *Exxon Valdez*, al encallar en 1989, derramando 41 millones de litros de crudo, seguido del derrame de *British Petroleum* en aguas profundas, por la plataforma *Horizon* en 2010, la cual vertió 780 millones de litros y el accidente en Dalian, China, en julio 2010 derramó aproximadamente 1.5 millones de litros de crudo en el mar [2].

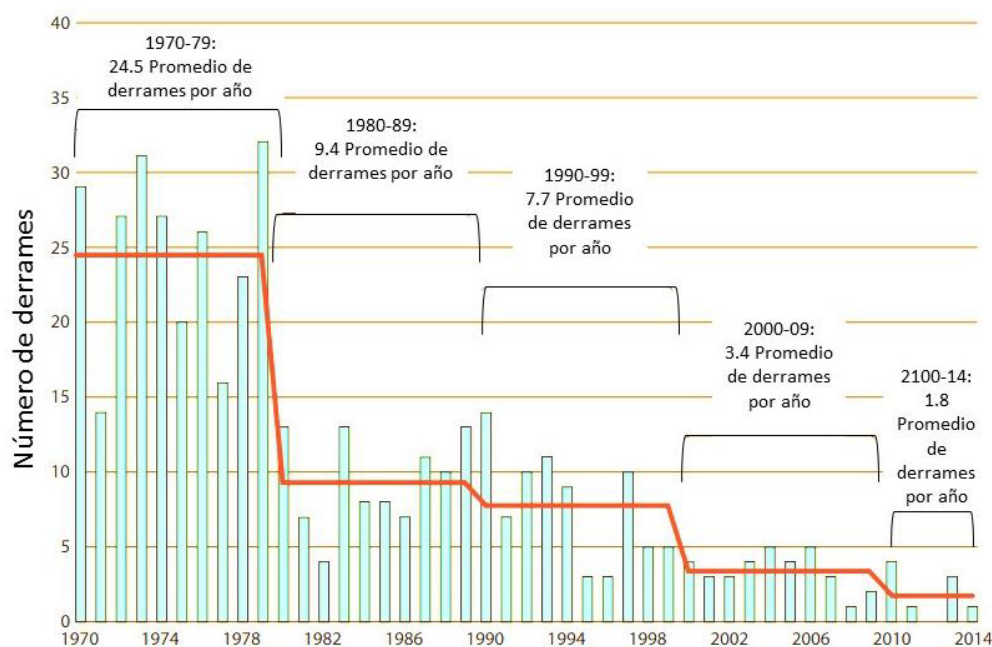


Figura 0.1 Gráfico de derrames en las últimas cinco décadas. Fuente: International Association of Oil & Gas Producers 2015 [3]

El promedio de los derrames asociados principalmente al transporte del crudo que se han presentado en las últimas cinco décadas ha disminuido considerablemente, Figura 1.1. Cabe señalar que esta media estadística considera sólo derrames superiores a 700 toneladas de

crudo [3]. Sin embargo, los niveles de remoción se ven limitados por varios factores ambientales y fisicoquímicos [4]. Así también, el tiempo de respuesta que tengan los cuerpos de contingencia de este tipo se ha reducido considerablemente en los últimos años [3].

En México existen extensas áreas contaminadas con hidrocarburos procesados del petróleo, debido a las actividades propias de la industria petrolera como son la extracción, la refinación y la distribución, siendo esta última la mayormente asociada con accidentes ocasionados durante la toma clandestina (TC) de hidrocarburos. Se estima que en los últimos 20 años la industria petrolera mexicana ha reportado pérdidas por más de 50 mil millones de dólares, comprometiendo seriamente al medio ambiente; el sector agrícola y la economía nacional [5]. Gran parte de las TC se presentan en zonas rurales; en el 2014 Petróleos Mexicanos (Pemex) reportó la clausura de 4,125 tomas clandestinas, cifra que representa un 43.7% mayor con respecto al 2013. Tamaulipas fue la entidad en la que mayormente se presentó este delito, al identificarse 641 TC en los ductos de Pemex Refinación, lo que representa un 16% de lo reportado a nivel nacional, seguido del estado de Guanajuato con 524 TC, lo que representó un 13%; Sinaloa reportó 519 TC (13%) y Jalisco 359 TC (9%) [6]. Una de estas TC representó al menos 400 barriles de petróleo derramados del oleoducto Madero-Cadereyta de Pemex, provocando afectaciones en una extensión de 23 kilómetros del río San Juan en el estado de Nuevo León, durante 2014, impactando negativamente en la flora y la fauna[7] adyacentes, así como en los ecosistemas directos que subsisten en el río y en general, la actividad económica de los pobladores del lugar afectado

Dentro de los principales problemas ambientales relacionadas con los hidrocarburos, la contaminación marina con petróleo ha sido considerada un tema de preocupación internacional, debido a que las afectaciones a los ecosistemas marinos son incalculables en la mayoría de los casos, lo que a su vez pone en riesgo la sostenibilidad de estos recursos, no sólo en los lugares donde se desarrolla el derrame, sino que incluye a todos los ecosistemas marinos provocado por el cambio de las mareas [8]. Sin embargo, es bien conocido que los derrames que se provocan en tierra tienen afectaciones en los mantos freáticos donde la disponibilidad del oxígeno es limitada, y a su vez, las condiciones de biodisponibilidad y recalcitrancia de los compuestos químicos limita su remoción por los microorganismos y las enzimas generadas para su biodegradación. Cabe señalar que, bajo condiciones anaerobias,

la biodegradación de HAPs se puede desarrollar en condiciones *insitu* desarrollándose por nitrato reducción, sulfato reducción, reducción de hierro, y reducción de manganeso (IV), [9].

1.1.1 Principales fuentes de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

El carbón mineral es uno de los principales energéticos asociados con la producción de HAPs, se relaciona directamente al proceso de combustión en que se desarrolle, como las condiciones de temperatura y las cantidades de oxígeno, entre otras [10]. La quema de material orgánico asociado con el proceso de pirólisis ha reportado que favorece la formación de compuestos de 2, 4 y hasta 7 anillos aromáticos [11].

Es bien sabido que el petróleo está conformado por una mezcla de hidrocarburos lineales, saturados, aromáticos asfaltenos y resinas [12]. En menor proporción, se pueden encontrar compuestos de nitrógeno, azufre y una combinación variada de metales y compuestos inorgánicos, todos éstos se representan a través de cadenas de carbono con diferentes pesos moleculares y otros compuestos orgánicos, que se pueden clasificar en cuatro fracciones: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos [13].

Dentro de los combustibles derivados del petróleo, el diésel es de suma utilidad, debido a su eficiencia energética y bajo costo para el desarrollo de la vida moderna. Este hidrocarburo está conformado por una mezcla compleja de hidrocarburos, encontrando principalmente hidrocarburos lineales, hidrocarburos alifáticos cíclicos y ramificados, alquenos y compuestos aromáticos. Sin embargo, el uso irresponsable de este combustible puede provocar graves daños al medio ambiente, debido a su conformación y presencia de compuestos recalcitrantes [14], los cuales constituyen del 20-40% el diésel comercial en los Estados Unidos, encontrando principalmente compuestos de un anillo, aromáticos de 2 anillos (naftalenos), además de los Nafto-aromáticos conformados de 3 anillos. Por último, las ciclo-parafinas también pueden estar presentes en el diésel, pero a concentraciones menores [15].

En particular, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de compuestos que están conformados principalmente por dos o más anillos aromáticos que pueden o no estar

unidos a una cadena lineal, angular y con diferentes isómeros. Éstos se pueden clasificar como HAPs de alto y bajo peso molecular, dependiendo del número de anillos aromáticos que presenten. Los HAPs de bajo peso molecular se caracterizan por una mayor volatilidad, solubilidad en diversos solventes y una mayor facilidad de degradación; por el contrario, los HAPs de alto peso molecular se fijan fuertemente a las partículas del suelo y se mantienen en suspensión en ambientes acuosos; por lo tanto, poseen propiedades como alta recalcitrancia a la degradación microbiana, lo que representa un serio riesgo para la salud humana bajo una exposición persistente, debido a su alta toxicidad y sus propiedades carcinogénicas [16].

Los HAPs son contaminantes que pueden persistir en el medio ambiente durante mucho tiempo y pueden ser transportados largas distancias. Debido a la alta tendencia de ser lipofílicos, tienen el potencial de bio-acumularse en los compartimientos con alto contenido de grasa confiriéndoles efectos adversos en diversos organismos, incluyendo seres humanos. Además, se conocen sus efectos mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos, y su asociación con alteraciones en la actividad del sistema endocrino [17]. En particular, se ha reportado que el fluoreno es uno de los HAPs que tiene una relación estrecha con síntomas neurológicos. Estudios realizados en ratones adultos mostraron que, al administrarse en forma aguda afecta la respuesta de concentración cerebral y provoca trastornos de ansiedad [18]. El fluoreno está caracterizado por una estructura molecular formada por tres anillos aromáticos fusionados[19] como se observa en la Figura 1.2.

El fluoreno es un compuesto perteneciente a los HAPs, de alto peso molecular, que está presente en el diésel comercial y su concentración puede variar de 50 hasta 150 ppm [20]. Por otro lado, se ha reportado una alta concentración en las plantas coquizadoras de carbón [21]. Una de las principales propiedades del fluoreno es que se filtra en el agua subterránea, ya sea como resultado de la contaminación directa, desde la contaminación del agua superficial o indirectamente a través del suelo por derrames de hidrocarburos [22].

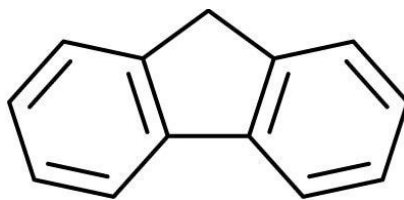


Figura 1.2 Estructura molecular del fluoreno

1.1.2 Recuperación y manejo de hidrocarburos en derrames

Existen diferentes técnicas referentes a la remoción de hidrocarburos, sin embargo, al presentarse un derrame, dependiendo de la magnitud de éste, ocurren diferentes procesos naturales y antropogénicos que se emplean para su tratamiento, tales como: la difusión, evaporación, emulsificación, dispersión, foto-oxidación, biodegradación, disolución, encapsulación y la sedimentación. Todos estos fenómenos se presentan simultáneamente después de un derrame, independientemente de que el origen sea accidental o por emanación natural [12]. Para minimizar los daños ambientales, se ponen en práctica diferentes estrategias, como la contención y recuperación mecánica, adsorción, la quema *in situ* y la aplicación de dispersantes, siendo esta última la que tiene un tiempo de respuesta rápida y factible económicamente para afrontar el derrame [23]. Los dispersantes están conformados por mezclas compuestas principalmente de tensoactivos y otros productos químicos, los cuales son vertidos directamente en el sitio afectado [24]. Los dispersantes provocan una reducción de la tensión interfacial entre los hidrocarburos y el agua, lo que provoca una estabilidad, que promueve la dispersión y, como resultado, la biodisponibilidad para los microorganismos [25], [26].

La cantidad adicionada de los dispersantes, así como los factores ambientales que rodean a los sitios impactados, influyen significativamente en la eficiencia de la remoción y la biodisponibilidad. [24]. Sin embargo, se ha reportado que el aumento de la solubilidad química puede provocar el aumento de la toxicidad de los hidrocarburos, lo que pudiera producir inhibición microbiana. Se tiene el antecedente de la presencia de los surfactantes Corexit 9500A y Corexit 9527, cuatro años después de ser vertidos en las zonas afectadas [27], lo que ha puesto en duda sus efectos dispersantes en la biodegradación del petróleo. Estudios previos muestran que inhibe la biodegradación de petróleo [25].

1.1.3 Biodegradación alternativa para remediar la contaminación de hidrocarburos

Un abordaje de amplia utilidad consiste en la reducción efectiva de hidrocarburos, tanto en agua como en el suelo, y que se caracteriza principalmente por ser de bajo costo y alta eficiencia a bajas concentraciones, a través de la biorremediación. La biodegradación de hidrocarburos se puede desarrollar por medio de bacterias aerobias estrictas, cuando existe acceso a las aguas superficiales que contienen oxígeno. Por otro lado, las bacterias anaerobias, las anaerobias facultativas y las anóxicas estrictas también son consideradas de gran importancia durante la biodegradación, ya que con su aplicación se reducen los costos relacionados con los procesos de aireación, obteniendo grandes eficiencias de degradación [28]. A pesar de que los hidrocarburos de petróleo pueden ser degradados por bacterias, hongos, levaduras y microalgas, el potencial de biodegradación generalmente disminuye a partir de n-alcanos a alcanos ramificados, compuestos aromáticos, alcanos cíclicos y compuestos aromáticos. La mineralización de mezclas complejas de hidrocarburos, como el diésel o HAPs, por lo general requiere de la colaboración de varias especies de microorganismos, formando comunidades. [29]. La implementación de las condiciones de biodegradación de compuestos altamente recalcitrantes se ha estudiado empleando consorcios bacterianos[16], [30], [31], hongos [19], [32], entre otros.

Los sitios contaminados con agentes químicos a menudo requieren de estrategias biológicas, es por eso que los métodos de biodegradación son particularmente importantes para la rentable remoción de petróleo y sus derivados. Un hallazgo importante en estudios realizados previamente de biodegradación es que la diversidad microbiana refuerza la posibilidad de utilizar opciones ambientalmente aceptables para la biodegradación o mineralización de contaminantes en compuestos menos dañinos para el medio ambiente [33], [34].

La remoción de compuestos recalcitrantes del medio ambiente ha tenido una importancia mayor, debido en parte a su asociación con padecimientos crónicos y estragos en la salud de los seres humanos. Sin embargo, los procesos de tratamiento biológico requerirán el desarrollo de consorcios enriquecidos a través de aclimatación de los microorganismos a fuentes de

carbón que sean de interés. Para este caso, es la degradación de HAPs, en particular fluoreno, el cual se encuentra dentro de la lista de compuestos de prioridad de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), cuya presencia se reportó en medios acuáticos. Debido a esto, el presente estudio consiste en la evaluación de la biodegradación del fluoreno en reactores *batch* y determinar las cinéticas de biodegradación en un reactor de flujo ascendente, utilizando un consorcio facultativo.

1.2 Justificación

La reciente apertura del mercado de hidrocarburos en México, promovida por las actuales reformas energéticas, puede presentar un reto no solo para la comercialización e importación [35], sino también en materia ambiental, ya que se desconoce ampliamente la legislación relacionada con la calidad de los combustibles que se importarán a nuestro país. Combustibles importados como el diésel presentan agentes cancerígenos mutagénicos y recalcitrantes [16], [17] pertenecientes a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), los cuales se encuentran en la lista de prioridad a tratamiento por parte de la USEPA [36]. Aunado a lo anterior, la necesidad de conocer la capacidad y la velocidad de remediación de los ambientes naturales contaminados por derrames accidentales de hidrocarburos y el compromiso de nuestro país establecido desde 1992 para ejercer acciones en materia ambiental con la Organización de las Naciones Unidas (ONU) dictan a la necesidad de desarrollar para sus tratamientos tecnologías eficientes y de bajo costo.

En este sentido, el uso de bacterias adaptadas a ambientes de complejas condiciones para metabolizar los contaminantes derivados del petróleo como fuente de carbono y energía ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del agua residual que presentan hidrocarburos, debido en parte a la amplia gama de condiciones en las que se puede desarrollar. Sin embargo, la descomposición de los HAPs es lenta, debido en parte, por la limitación de recursos como oxígeno, nutrientes, biodisponibilidad y recalcitrancia [9]; es por ello que las evaluaciones cinéticas proveen información imprescindible, para así establecer constates de velocidad de

remoción del compuesto de estudio y una alternativa para este estudio se puede llevar a cabo mediante la evaluación cinética de Monod [37].

Empleando este modelo, el estudio cinético de la biodegradación de fluoreno (como molécula modelo recalcitrante de HAPs) se puede llevar a cabo utilizando un consorcio microbiano, ya que la biorremediación es una rama de las tecnologías de eliminación de hidrocarburos, además de ser un tratamiento amigable con el ambiente y de bajo costo. Esta tecnología puede ser implementada en suelos y aguas contaminadas, logrando la biodegradación o mineralización del contaminante de interés.

1.3 Hipótesis

Es posible la biodegradación del fluoreno, como molécula modelo de un compuesto aromático recalcitrante en condiciones nitrato-reductoras, utilizando un consorcio microbiano facultativo aclimatado a diésel.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar las constantes cinéticas de la biodegradación del fluoreno, como molécula modelo de un compuesto aromático bajo condiciones nitrato-reductoras utilizando reactores *batch* y un reactor de flujo ascendente, empleando un consorcio microbiano anaerobio aclimatado a diésel.

1.4.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un método de análisis para la evaluación del fluoreno, utilizando cromatografía de gases.
- Promover el crecimiento de un consorcio microbiano en un reactor de flujo ascendente, utilizando roca volcánica (tezontle) como material de soporte.
- Generar las condiciones de reducción de nitratos en los consorcios microbianos
- Evaluar los patrones de biodegradación del fluoreno en condiciones de nitrato-reducción, utilizando reactores *batch*.
- Evaluar el efecto de la concentración inicial de fluoreno y los tiempos de retención en la degradación, utilizando un reactor de flujo ascendente
- Evaluar la cinética de biodegradación del fluoreno, en reactores de flujo ascendente.

Capítulo 2 Antecedentes

2.1 Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos formados principalmente por átomos de carbono e hidrógeno, que se organizan en familias con estructuras similares y presentan enlaces estables de carbono-carbono, además de ser sustancias no polares, con muy baja o nula solubilidad en el agua [38].

Los hidrocarburos se clasifican en cuatro tipos, en función del tipo de enlace carbono-carbono de su estructura molecular:

- Alcanos: enlace sencillo carbono-carbono
- Alquenos: enlaces dobles carbono-carbono
- Alquinos: enlaces triples carbono-carbono
- Hidrocarburos aromáticos: estructura anillada carbono-carbono, frecuentemente con electrones en resonancia.

2.1.1 Principales vectores energéticos

Los biocombustibles son aquellos que se obtienen a partir de biomasa; dentro de los principales biocombustibles se encuentra, por un lado, el bioetanol, que se puede obtener del maíz, del almidón de yuca y de residuos ricos en lignocelulosa y como subproducto de la industria azucarera. Por otro lado, el biodiesel se obtiene principalmente del aceite de palma del girasol, de soya y de higuierilla [39]. Sin embargo, la sostenibilidad de la producción masiva se encuentra sujeta a:

- Posibles afectaciones a la seguridad alimentaria e incrementos de los costos.
- Políticas públicas de gobiernos para fortalecer al campo.
- Evaluación previa de cambio de uso de suelo y estrategias de mitigación.

Pese a esto, los biocombustibles representan una alternativa viable desde el punto de vista ambiental y económico sobre todo los países en desarrollo [40], [41].

Por otro lado, entre las principales fuentes de hidrocarburos no renovables y principal soporte de las economías y el crecimiento económico se encuentra: el Gas natural 23 %, el Carbón

mineral 38% y el Petróleo 36%. En conjunto suministran el 97 % de la energía que se consume en la actualidad a nivel global [42].

El gas natural puede obtenerse de yacimientos, ya sea aislado, o con la presencia de petróleo. En la Figura 2.1 se muestra la composición del gas natural, en función de su estado de extracción, siendo el gas metano el que predomina hasta en un 90 %, mientras que la presencia de otros gases como propano, etano, butano, N_2 , CO_2 , vapor de agua y derivados de azufre es la proporción que puede cambiar, en el gas natural, entre un yacimiento y otro [43].

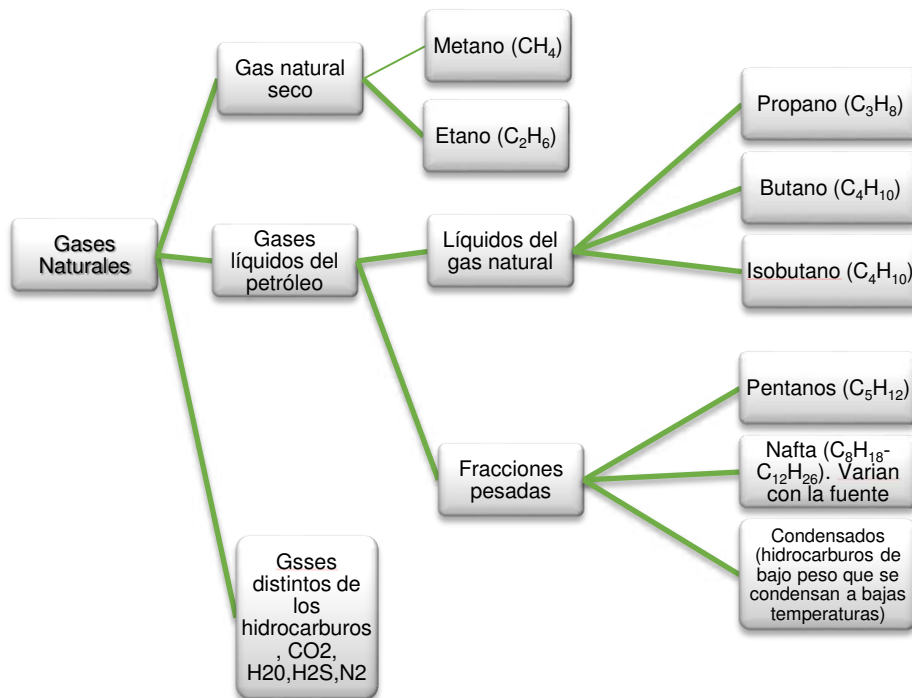


Figura 2.1 Componentes del gas natural seco y líquidos del gas húmedo

El carbón mineral es una roca de origen orgánico originada por los cambios en las eras geológicas; es un recurso finito usado como fuente de hidrocarburos, que se compone principalmente de carbono, oxígeno, hidrógeno, trazas de azufre y nitrógeno; adicionalmente presenta la presencia de CO_2 , CH_4 , compuestos aceitosos, alquitrán y compuestos aromáticos [21], [44].

La clasificación del carbón mineral se basa en su contenido en carbono. En la escala de mayor a menor contenido de carbón se clasifican de la siguiente manera:

- **Turba:** depósito de materia orgánica en descomposición, con un contenido de carbón 45-60 %, es el primer paso a la carbonización natural, conserva una gran cantidad de agua, hasta un 90 %. Si pierde esta humedad, se contrae. Se caracteriza por un escaso poder calorífico.
- **Lignito:** depósito de formación reciente, es la fase que sigue después de la hulla, con un contenido de carbón 60-75 %, presenta una turba fosilizada con una calidad superior.
- **Hulla:** carbón natural con apariencia brillante, con un contenido de carbón 80-90 %, con la presencia de oxígeno 3-20 % hidrogeno 1-5 %.
- **Antracita:** presenta un 95 % de carbón y dificultad para arder, pero tiene un alto poder calorífico. Es más brillante que la hulla.

La ceniza es un componente inorgánico no combustible, que se presenta en el carbón. Se puede presentar de manera intrínseca, o extrínseca, lo cual, afecta directamente su calidad [45].

Por último, el petróleo está conformado por átomos de carbono e hidrogeno, con diferentes enlaces y estructura, lo que le proporciona diferentes características las cuales determinan su comportamiento y su composición. Adicionalmente, puede existir la presencia de azufre, nitrógeno y oxígeno [46], que se consideran como impurezas y son factores determinantes al evaluar su calidad [47].

En la Figura 2.2 se muestran los principales procesos a los que se tiene que someter el crudo para poder obtener los productos comerciales que se conocen y consumen.

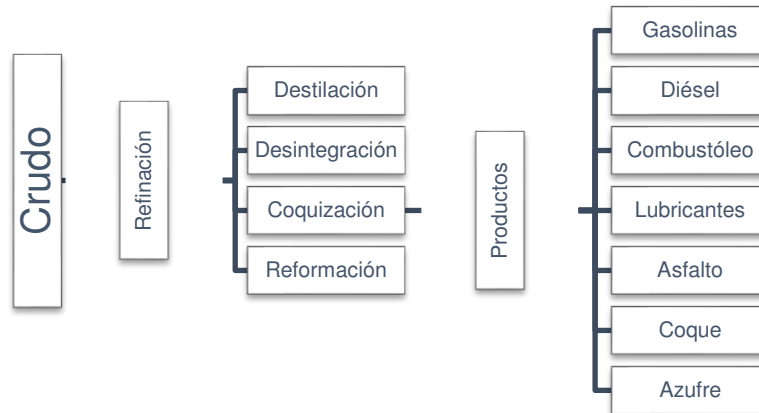


Figura 2.2 Proceso de refinación de petróleo y principales productos

El presente proyecto de investigación se enfoca en el petróleo, ya que los derivados obtenidos del crudo son en realidad una serie de compuestos de diferentes pesos moleculares. En la Figura 2.3 se hace mención de algunos de estos compuestos los que pueden estar presentes en las gasolinas, el diésel, y el combustóleo, principalmente [46].

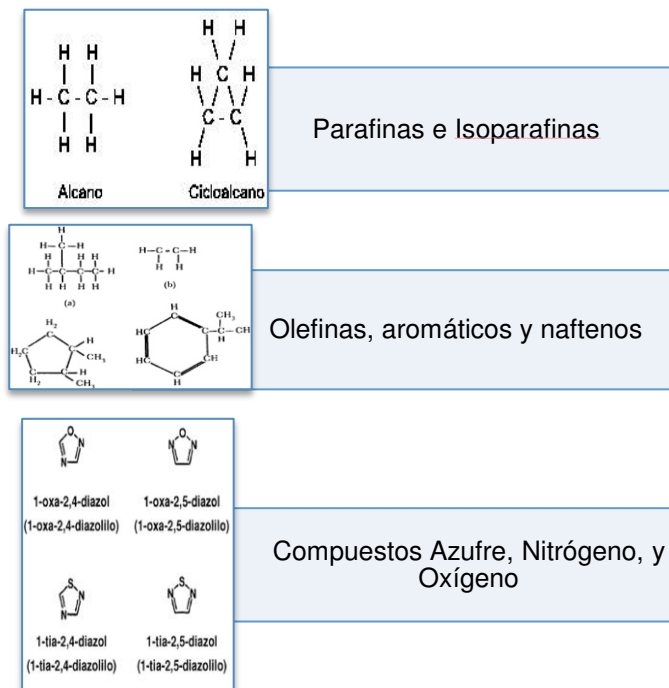


Figura 2.3 Compuestos presentes en los derivados del petróleo

Es importante mencionar la amplia variedad de compuestos aromáticos que están presentes en el crudo, siendo algunos de ellos considerados como de alto riesgo para la salud según la clasificación de USEPA [32].

2.1.2 Los hidrocarburos y el medio ambiente

El desarrollo de las economías y el crecimiento de la población a nivel global, han traído serias repercusiones sobre el medio ambiente; el uso desmedido de combustibles fósiles para cubrir las necesidades en materia energética ha provocado cambios en la composición química de la atmósfera, provocando la degradación de la capa de ozono y con ello una serie de problemas entre los cuáles se encuentra principalmente el calentamiento global.

Los cambios que se prevén materia de cambio climático han sido tratados por 195 naciones en la pasada convención celebrada en Paris, Francia llamada Cop 21 en noviembre 2015, en un esfuerzo en conjunto para lograr que el aumento de la temperatura se mantenga por debajo de los dos grados centígrados [48]. Sin embargo, los esfuerzos se deben redoblar en materia del manejo y transporte de hidrocarburos, para minimizar al máximo la tasa de accidentes y los riesgos ambientales que se desencadenan ante tales siniestros [3]. La presencia del crudo y sus derivados en el medio ambiente, derivada de la actividad antropogénica compromete seriamente a los ecosistemas y, por consiguiente deriva en problemas para el ser humano, asociados con la presencia de agentes mutagénicos y cancerígenos [12], [23], [49].

2.1.2.1 El derrame de hidrocarburos a nivel global y en México

Un derrame de petróleo se define como cualquier descarga, liberación, rebose, achique o vaciamiento de hidrocarburos [50], según la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Petróleos Mexicanos PEMEX [6] menciona que las fugas de hidrocarburos corresponden a la salida o escape de un líquido o gas, causadas por algunos efectos de corrosión en la estructura metálica de ductos o tanques, laminaciones o grietas, emanaciones naturales, golpes, defectos de fabricación y TC. El estudio de la contaminación por petróleo en los océanos y las zonas costeras enfrenta dos problemas provocados por las

actividades humanas: primero la alteración de los ecosistemas marinos y costeros originada por las operaciones de extracción, refinación, transporte, almacenamiento y uso del petróleo, como principal fuente de energía; y segundo, la innegable necesidad de preservar y proteger a los recursos marinos para usos humanos actuales y futuros.

A nivel mundial ocurren alrededor de 7,500 derrames anualmente, con un volumen aproximando de 6.1 millones de toneladas métricas, éstas se introducen en los mares y océanos, y equivalen a 120 mil barriles diarios aproximadamente. Las estadísticas muestran que:

- Se pierde un barril de petróleo por cada millón de barriles transportado.
- Ocurre un accidente por cada 10,000 viajes ejecutados.
- Dos pozos se descontrolan, por cada 1000 pozos marinos perforados.

Las estadísticas también reportan como causas específicas de derrames de hidrocarburos:

- La ruptura de los equipos y oleoductos
- La corrosión (interna o externa)
- La falta de mantenimiento en los equipos y en las instalaciones
- Los errores humano
- Las tomas clandestinas

Otras causas menos frecuentes son: el movimiento de las placas tectónicas, las descargas a través de los ríos que desembocan al mar y que han arrastrado hidrocarburos existentes en la tierra, la precipitación de compuestos presentes en la atmósfera que son absorbidos y arrastrados por la lluvia, los derrames naturales submarinos o chapopoterías naturales, las guerras, la negligencia y los accidentes. Hipotéticamente, si no ocurriesen derrames de petróleo derivados de la extracción en pozos petroleros y derivados de la actividad del transporte, de cualquier forma el mar estaría expuesto a recibir y asimilar, en promedio, unas 60 mil toneladas métricas por año, concentradas principalmente en regiones petroleras cercanas a las zonas costeras [51].

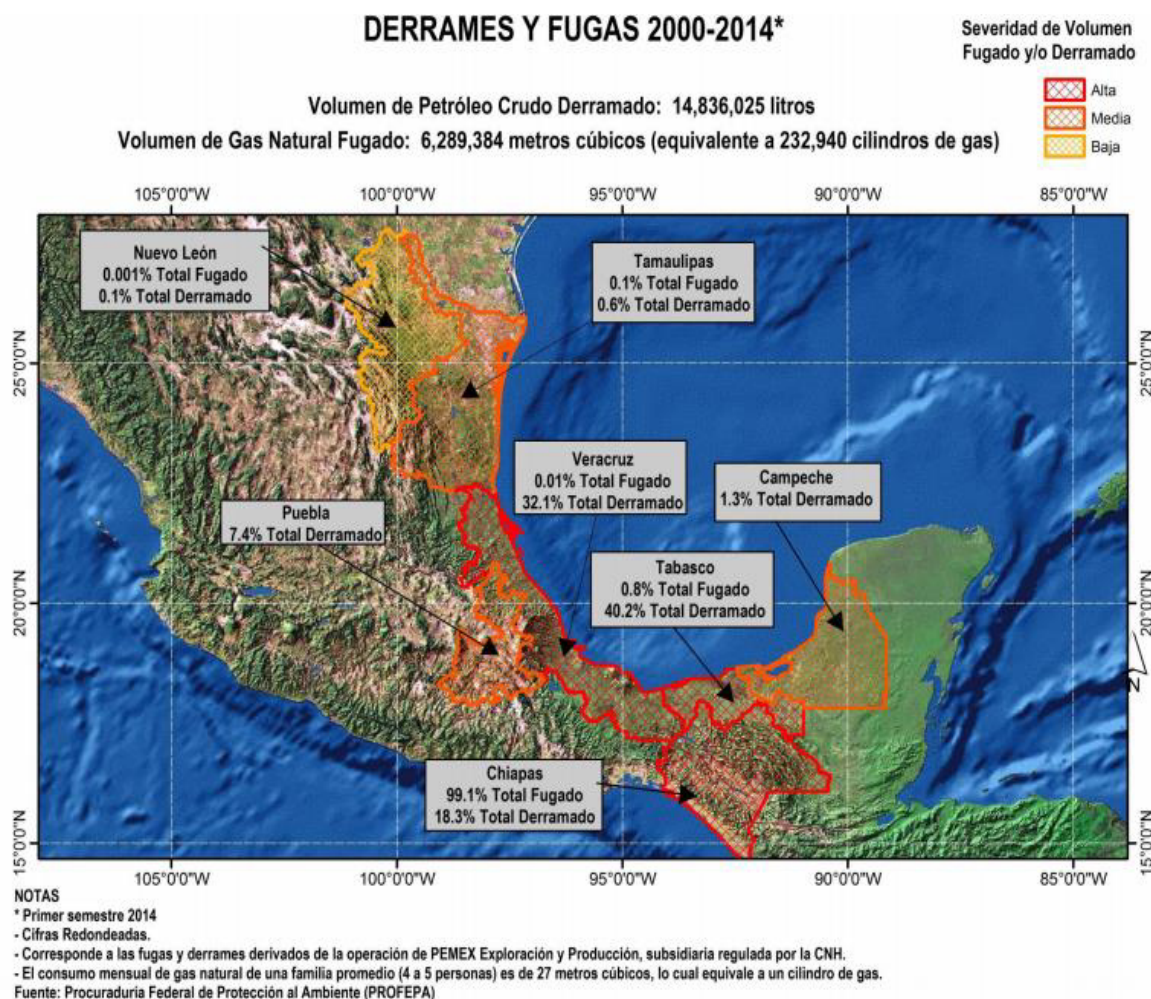
La extracción de petróleo en México se concentran en el golfo de México. En el año 2014 se contaba con 448 campos en producción, 9077 pozos en explotación, 258 plataformas marinas,

5090 km de oleoductos y 8743 km de gasoductos repartidos a lo largo de la República Mexicana y utilizados para el traslado y la refinación del crudo y sus derivados Figura 2.4 [52].



Figura 2.4 Distribución de las instalaciones de la industria petroquímica en México Anuario Pemex 2014 [53]

Se estima que en los últimos 20 años los derrames de hidrocarburos han provocado pérdidas por más de 50 mil millones de dólares a Pemex, afectando considerablemente al ambiente. Este tipo de compuestos derramados se acumulan en ecosistemas marinos y terrestres, siendo responsables del deterioro de grandes extensiones de suelo [5].



*Figura 2.5 Volumen de derrame de petróleo crudo y volumen de gas natural por estados del 2000-2014
Fuente: CNH [54]*

Datos estimados de la Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH) describen que gran parte de los derrames que se han reportado desde 2000 al 2014 se han cuantificado; sin embargo, aún queda la duda de todos aquellos que no se han cuantificado. Cabe señalar que tampoco existe una clasificación relacionada de los tipos de hidrocarburos que se derraman, lo que hace muy complejo determinar las condiciones en que se encuentran las zonas afectadas. Los estados que reportan una mayor incidencia de derrames son Veracruz y Tabasco; en este mismo reporte se analiza el lugar donde se presenta mayor contaminación por año, siendo 2007 el año en el que se presentó el mayor derrame de hidrocarburos en ambientes marítimos; el año 2009 presentó el mayor derrame en el territorio nacional (Figuras 2.5 y 2.6) [53]. Durante 2014, Pemex reportó que se clausuraron 4,125 tomas clandestinas, esta cifra representa un 43.7% mayor a lo reportado durante el 2013.[6].

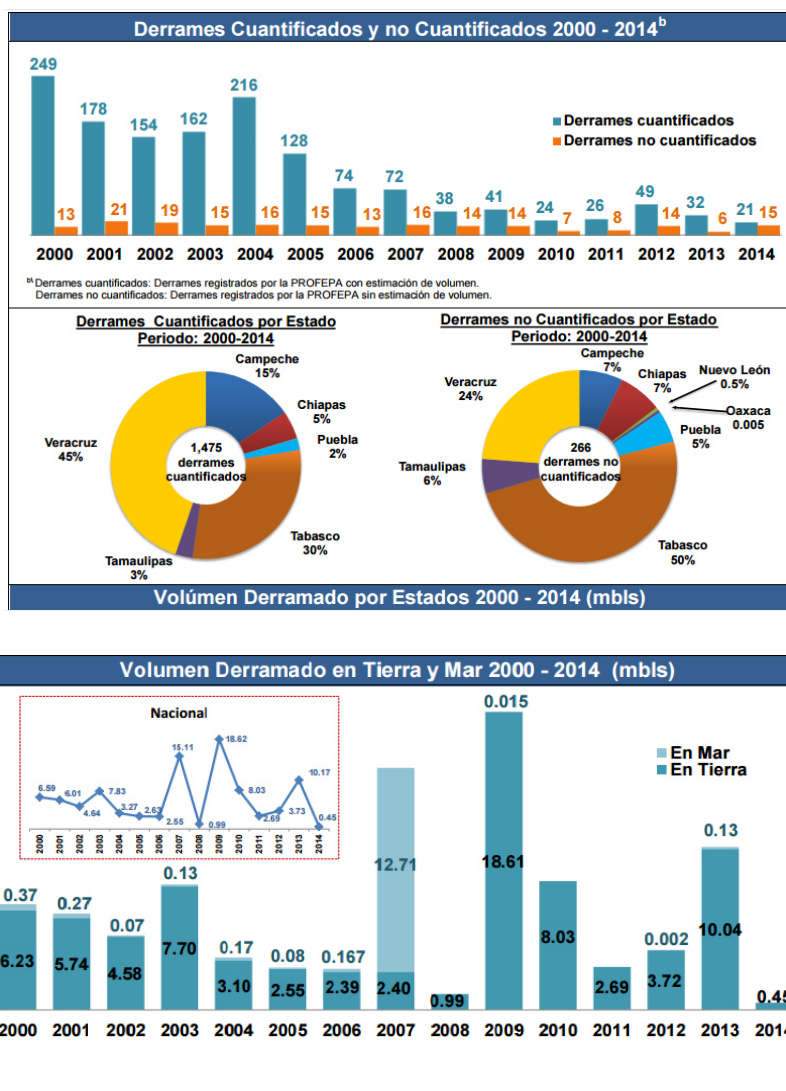


Figura 2.6 Derrames de Hidrocarburos cuantificados y no cuantificados, Volúmen Derramado por Estados y volúmen derramado en tierra y en el mar del 2000-2014 Fuente CNH [54]

Uno de los principales problemas en la actualidad se debe a que algunas empresas petroleras han subcontratado a compañías especializadas en biorremediación para restaurar y recuperar los suelos, logrando detener los derrames; pero sin llevar el estudio a término para determinar el daño ecológico en las áreas afectadas, a través del tiempo. La mayoría de las investigaciones sobre los derrames de hidrocarburos en México presentan este problema y están enfocadas en procesos físico-químicos, sin dar seguimiento en los años siguientes al proceso de biorremediación, en el lugar afectado hablando en términos ambientales [5].

2.1.3 Alternativas de remediación de hidrocarburos

La industria que ha presentado un mayor crecimiento e inversión en las últimas tres décadas en México es la petrolera; uno de los estados que destaca es Tabasco, que reporta gran parte de su producción en tierra, lo que ha provocado estragos en el medio ambiente, contaminación de los acuíferos y de la flora [54]. En este se encuentra el Activo Cinco Presidentes que se ve afectado por grandes cantidades de petróleo en el suelo, derivado de la actividad petrolera que se ha reportado que la fitorremediación con muestras de suelo obtenidas del activo Cinco Presidentes las que señalan, indican la presencia de petróleo y sobre todo hidrocarburos de alto peso molecular. En este trabajo se logró la remoción de hasta un 48 % [55]

Otro de los Estados que tiene una gran aportación en el ámbito de la producción de petróleo es Campeche, donde se encuentra la sonda del mismo nombre, que hasta el 2003 reportaba el 82 % de la producción total de crudo. Los problemas asociados con la contaminación de esta zona importante para el país son limitados y se carece de información de los ecosistemas antes de ser instalada la industria petrolera en la zona [56]. Se cuenta con el antecedente de que en esta zona la biodiversidad se ha adaptado a la presencia de hidrocarburos, ya sea por la emanación natural de petróleo y metano o por la actividad petrolera antropogénica [57]. A éste se suma el estado de Veracruz, con una creciente industria petrolera, que ha presentado derrames y fugas de ductos en los últimos años [58], sin contabilizar los daños a los ecosistemas marinos y terrestres. Por ejemplo, las zonas de manglar se caracterizan por presentar una alta concentración de hidrocarburos, principalmente del tipo HAPs [59].

La biorremediación de hidrocarburos se ha estudiado desde la década de 1970, mientras que la biodegradación de HAPs se ha venido desarrollando por bacterias, hongos y algas las cuales poseen la habilidad catabólica para emplearse en la remediación del suelo y del agua superficial y subterránea contaminados por HAPs. Actualmente, la biorremediación ha demostrado ser eficiente en la remoción de HAPs de bajo peso molecular en suelos contaminados; sin embargo, a medida que se incrementa el peso molecular son generalmente recalcitrantes para los microorganismos [60]. La mineralización o biodegradación de contaminantes se debe desarrollar preferentemente *in situ*. Esta tecnología resulta eficaz en el tratamiento de hidrocarburos ya sea por consorcios o especies definidas separadas de suelos

o lugares contaminados con hidrocarburos [61]. El orden general de la degradación de hidrocarburos por microorganismos o consorcios microbianos parte de los fácilmente biodegradables a los más recalcitrantes. En términos generales, los consorcios de bacterias que degradan el petróleo tienen una mayor eficiencia de biodegradación que si se empleara un solo tipo de bacteria, ya que un solo tipo de microorganismo no puede degradar una amplia gama de compuestos complejos presentes en el crudo [13].

Malik y Ahmed realizaron la biodegradación de muestras de petróleo de la compañía Pakistán Oil and Gas Development Company [62], mediante un consorcio de quince cepas bacterianas autóctonas. El consorcio estuvo formado por bacterias del tipo *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Psychrobacter sp.* concluyendo que la eliminación total de alifáticos y aromáticos fue del 94% y 93%, respectivamente. Entre los diversos componentes de la degradación del petróleo por el consorcio bacteriano, se encuentra la eliminación de alcanos que fue de alrededor del 90% para el tridecano (C₁₃), seguido del pentadecano (C₁₅) a 77%, octadecano (C₁₈) a 74%, mientras que otros alcanos mostraron 56-69% de degradación después de 24 días de incubación. Mientras que los compuestos aromáticos (benceno, tolueno y xileno) se evaporaron en el cuarto día de incubación, la eficiencia de remoción de las fracciones poliaromáticas (antraceno, fenantreno y pireno) fue del 46% al 55%, después de 24 días [62]. Por otro lado, especies gram-negativas que pertenecen a las bacterias *Acineto*, *Pseudomonas*, *Alcanivorax* y otros géneros relacionados están estrechamente relacionadas con la degradación de hidrocarburos derivados del petróleo [1], [61]. Además, bacterias gram positivas aisladas pertenecientes a los géneros *Rhodococcus* y *Bacillus* son ampliamente reconocidos por su capacidad para degradar los hidrocarburos. De hecho, *Bacillus sp.* ha atraído el interés en aplicaciones biotecnológicas y estrategias de biorremediación, por su efectividad de remoción de hidrocarburos de cadena larga como el diésel [34].

El éxito de la biorremediación depende principalmente de tres variables para que ocurra la remoción exitosa de contaminantes derivados del petróleo [14].

- La accesibilidad del contaminante para el microorganismo degradante.
- La optimización de la actividad biológica.

- La inherente biodegradabilidad del contaminante

Gozde Onur y col. realizaron el estudio de degradación del diésel comercial con bacterias aisladas a partir del agua residual de una refinería de crudo, siguiendo la degradación de diésel por cromatografía de gases. Las bacterias fueron evaluadas con un índice de remoción del 60% y el 92% de diésel en 14 días, identificado que la especie *Acinetobacter haemolyticus* es la que alcanzó 92 % de remoción en 14 días [29]. Por otro lado, es bien sabido que los hongos también cuentan con la capacidad de degradar hidrocarburos. Después de separar setenta y dos diferentes sepas de hongos provenientes de setas de madera podrida, se pusieron a prueba en función de su capacidad de crecimiento en un medio de agar de extracto de malta a diferentes valores de pH, utilizando asfalto como fuente de carbono. En este trabajo se llegó a la conclusión de que la especie *Pestalotiopsis sp* exhibió la capacidad de degradar todos los tipos de hidrocarburos presentes en el petróleo, en un medio líquido a pH 4.5. Durante la biodegradación de una mezcla de compuestos alifáticos (n-decano, n-undecano, n-dodecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-octadecano, n-nonadecano, n-eicosano y pristano), se detectaron quince metabolitos diferentes, entre los que destacan: grasas, alcoholes, aldehídos grasos y ácidos grasos de baja toxicidad. Esto sugiere que *Pestalotiopsis sp.* es una fuente potencial para la biorremediación de ambientes contaminados con petróleo [2].

Por otro lado, los suelos contaminados con hidrocarburos pueden llegar a ser utilizados como fuente de consorcios de microorganismos. E. Moliterni y col. [34] lograron aislar consorcios microbianos obtenidos de suelos contaminados situados en una refinería de petróleo y se aclimataron para crecer en diésel como la única fuente de carbono. Utilizando reactores tipo *batch*, estudiaron los efectos de la temperatura y la concentración en la degradación de diésel, logrando identificar diferentes especies presentes en más de un consorcio y una inhibición térmica en la biodegradación a 35 °C. En el resto de los experimentos, más del 80% del sustrato fue degradado después de 40 h de tratamiento. Estos resultados confirman la viabilidad del uso de los sitios contaminados o microorganismos aclimatados como fuentes de consorcios mixtos para la degradación de hidrocarburos.

Estudios realizados con muestras de sedimentos frescos del Río Wouri, en Camerún, demostraron potencial de aplicación en la degradación de diésel, utilizando un consorcio bacteriano aislado a partir de sedimentos de manglar [61]. Se realizó una serie de pruebas diseñadas para evaluar la eficiencia de los consorcios autóctonos y tres cepas exógenas puras para degradar diésel con y sin la adición de nutrientes. Se logró un rango de degradación de 77 y 90%. El consorcio mostró resistencia a la tensión inducida por el contaminante; el suministro aumentó significativamente la tasa de degradación del diésel después de 35 días.

Estudios recientes no sólo se han limitado en la degradación del petróleo y sus derivados a través de microorganismos sino que también emplean materiales de soporte. Yuan Chen y col. [14] reportaron el uso de una matriz carbón de bambú modificado (MCB) como material de soporte para medir la capacidad de degradación del microorganismo inmovilizado y este se comparó con los microorganismos de forma acuosa sin soporte; es decir, las bacterias planctónicas inmovilizadas degradan cantidades relativamente altas de diésel (> 80%). *Venetianus acinetobacter* inmovilizada en MCB, demostró una eficiencia superior en la degradación de diésel del 94%, en comparación con el cultivo en forma acuosa durante un período de 3 días. Así los resultados justifican la aplicación del MCB como la matriz de soporte para la inmovilización de microorganismos en la eliminación de compuestos de diésel presentes en agua residual industrial debido a que promueven el incremento de degradación del hidrocarburo.

Para que sea considerada eficaz la biodegradación, el producto obtenido en la descomposición después de la biorremediación debe consistir en agua, dióxido de carbono y biomasa. Sin embargo, varios estudios han reportado que la actividad microbiana puede tanto convertir los hidrocarburos en compuestos no tóxicos o de baja toxicidad, así como también en compuestos con potenciales tóxicos superiores al hidrocarburo de origen, de ahí la importancia del cuidado de las variables y el monitoreo de la cinética de conversión [28], [33], [63].

2.2 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) y fuentes de emisión

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos que debido a su conformación se les considera recalcitrantes; esto quiere decir que pueden persistir largos periodos en el medio ambiente sin ser afectados por los factores bióticos y abióticos.

Los HAPs están constituidos por una estructura química de dos o más anillos fusionados [64]. Los HAPs pueden ser producidos por diferentes fuentes, como producto de una combustión incompleta de hidrocarburos o por la producción de derivados del petróleo [65]; también su producción se asocia con las fuentes naturales, tales como las filtraciones de petróleo y los escurrimientos de agua en sitios donde se presentaron incendios forestales [66]. Su presencia también se ha asociado con el carbón coque, principalmente con su proceso de producción de gas, ya que se han reportado altas concentraciones de HAPs en instalaciones y agua residual de plantas de gas coque [21], [67]. En la Figura 2.7 se puede apreciar las fuentes de emisión de los HAPs, principalmente asociados a una combustión menor que 200 °C [68], [69].

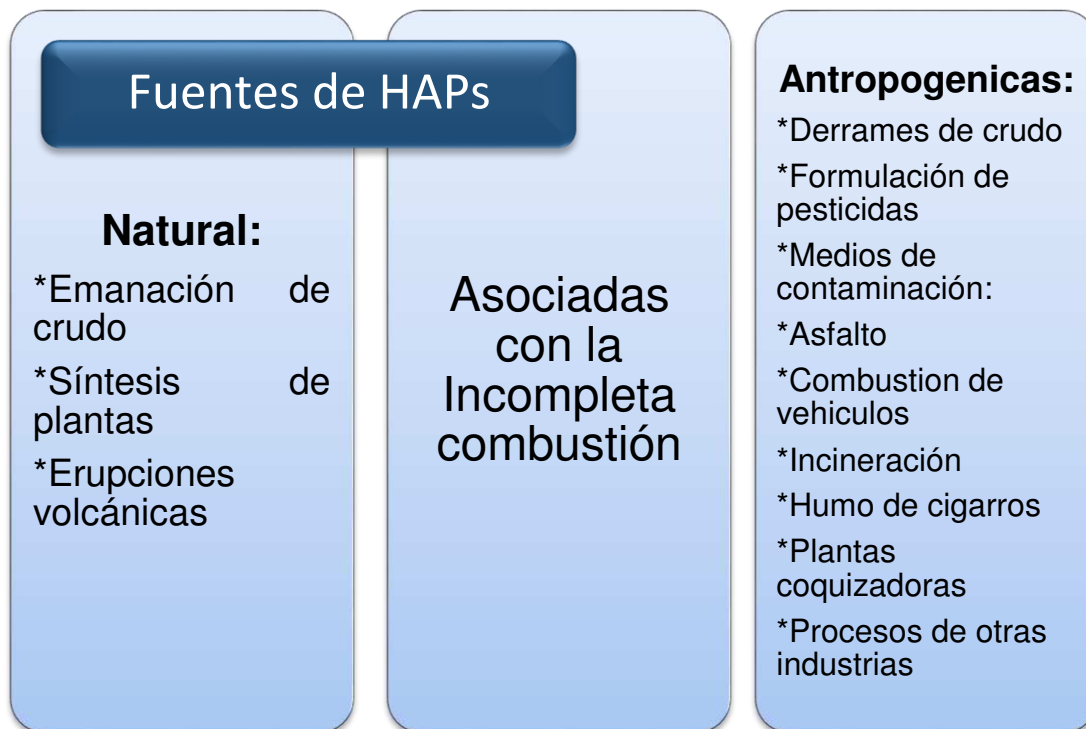


Figura 2.7 Principales fuentes de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

2.2.1 Clasificación de los HAPs de la USEPA

La USEPA ha establecido una lista de los 16 HAP's a los cuales se les asocia como precursores de cáncer y propiedades mutagénicas [22], [36]. En la Tabla 2.1 se mencionan los 16 HAPs y su solubilidad en medios acuosos. Se puede observar al fluoreno que reporta baja solubilidad en medios acuosos. Se observa también que, conforme se incrementa el número de anillos y el número de enlaces dobles, los compuestos se vuelven más recalcitrantes, lo que significa que pueden persistir en el ambiente por largos periodos de tiempo.

Tabla 2.1 Compuestos que conforma la lista de los 16 HAPs de la Agencia de Protección Ambiental (USEPA)

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	Estructura (# de anillos)	Peso Molecular (g/mol)	Solubilidad (mg/L)
Naftaleno	2	128.17	31
Acenafteno	3	154.21	3.8
Acenaftileno	3	152.20	16.1
Antraceno	3	178.23	0.045
fenantreno	3	178.23	1.1
Fluoreno	3	166.22	1.8
Fluoranteno	4	202.26	0.26
Benzo (a) antraceno	4	228.29	0.011
Criseno	4	228.29	0.0015
Pireno	4	202.26	0.132
Benzo (a) pireno	5	252.32	0.0038
Benzo (b) fluoranteno	5	252.32	0.0015
Benzo (k) fluoranteno	5	252.32	0.0008
Dibenzo (a, h) antraceno	6	278.35	0.0005
Benzo (g, h, i) perileno	6	276.34	0.00026
Indeno [1,2,3-cd] pireno	6	276.34	0.062

2.2.2 Toxicidad y repercusiones del fluoreno en la salud.

Dentro de los diferentes HAPs mencionados anteriormente, en el presente trabajo de investigación se trabajará sobre la biodegradación del fluoreno, descrito en la Figura 2, se compone de tres anillos aromáticos lo que representa un peso molecular de 166.22 g/mol y una baja solubilidad 1.9 gr/L (véase en la Tabla 1). Estas propiedades convierten al fluoreno en un contaminante recalcitrante [19], además de ser un compuesto altamente mutagénico una vez absorbido en los seres vivos de forma directa o incluso de manera indirecta al ponerse en contacto con el fluoreno [49], [68], [70]–[72].

2.2.3 Tratamientos de remediación de sitios contaminados con HAPs

En estudios previos se ha encontrado que los niveles de concentración del fluoreno presentes en el diésel comercial pueden variar de 50 hasta 150 ppm y 400 a 700 ppm respectivamente [20]. En el estado de Texas, E.U.A, fue evaluada la presencia de estos 16 HAPs en muestras tomadas en sitios contaminados con petróleo y sus derivados, encontrando altas concentraciones de todos los HAPs, en donde la presencia de fluoreno fue de alrededor de 24,776 mg/Kg en suelos contaminados con derrames de petróleo [49].

Los reportes en el nivel mundial sobre sitios contaminados con HAPs son variados y principalmente asociados con lugares que tienen o han tenido contacto con el petróleo o sus derivados. Todo esto representa un peligro para los ecosistemas y para el medio ambiente en general. Estudios realizados en peces que fueron adquiridos en localidades del golfo de arabia mostraron bioacumulación y presencia de HAPs e Hidrocarburos alifáticos (HA) [71]. Estudios similares en peces y sedimentos se han desarrollado en los E.U.A, particularmente en el río Mill, New Haven, Connecticut, habiéndose reportado la presencia de HAPs en los sedimentos de lodo y confirmando la presencia de compuestos aromáticos policíclicos en las muestras de peces analizadas [73]. También se ha asociado la presencia de HAPs con el crecimiento industrial y comercial de algunas zonas, como la bahía de Paranaguá en Brasil que es un puerto de gran actividad turística e industrial, donde se realizaron estudios en sedimentos de la bahía para determinar la presencia de HAPs confirmando que independientemente de las fechas de muestreo se presenta contaminación de HAPs [74].

Los estudios relacionados con la degradación de compuestos específicos presentes en los derivados del petróleo, se centran en cantidades relativamente pequeñas, debido a su dificultad de ser removidas o eliminadas por su recalcitrancia y solubilidad [13], [16], [34]. En particular, Baowei Chen y col.[75] estudiaron el patrón de crecimiento bacteriano, regulando la vía de degradación del pireno, por medio de la cepa *Mycobacterium sp.* Los ensayos se llevaron a cabo para estudiar el cometabolismo del pireno en presencia de fenantreno, fluoranteno como sustratos de crecimiento, logrando un aumento en la velocidad de degradación del pireno en presencia de fenantreno, y 4,5-pyrenediol como el único metabolito. Por otro lado, Zainab Mat Lazim y Tony Hadibarata [22] investigaron el impacto de los surfactantes no iónicos sobre la

eficacia de la degradación de fluoreno por el hongo *Polyporus sp.* en un medio acuoso. Se observó que el fluoreno se degrada en su totalidad en un período de incubación de 23 días; por medio de espectroscopia UV-vis se confirmó la presencia de dos metabolitos, 9-florenol y ácido protocatecuico.

Adicionalmente H. P. Bacosa y C. Inoue [76], reportaron un estudio de degradación de compuestos recalcitrantes HAPs midiendo el potencial de degradación de diez consorcios microbianos obtenidos de lodos de lugares contaminados después del tsunami de Miyagi, Japón. Dichos consorcios fueron evaluados en la biodegradación de fluoreno, pireno, y fenantreno. Las pruebas se realizaron en reactores *batch*, siete especies lograron la degradación completa de fluoreno y 95 % de remoción de pentateno, con un 40 % de pireno en el décimo día. La caracterización de los consorcios reveló la presencia de *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Dokdonella* y *Luteimonas*. Se concluyó que estos consorcios pueden aplicarse en la eliminación de compuestos recalcitrantes presentes en el medio ambiente.

2.2.3.1 Microorganismos asociados con la biodegradación de compuestos aromáticos policíclicos

Los microorganismos asociados con la biodegradación de HAPs es variada y creciente. En la Tabla 2.2 se hace referencia a diferentes HAPs y los principales microorganismos asociados a su degradación; sin embargo, los avances en la biorremediación son variados y surgen nuevas especies asociadas, en menor o mayor magnitud con la biodegradación de HAPs, por lo que en esta tabla no se muestra toda la variedad de especies de microorganismos asociados con la degradación de diferentes HAPs, y los porcentajes de biodegradación son variados ya que en algunos estudios se aplican sepas de una sola especie y en otros se aborda la aplicación de consorcios de especies sin embargo, los rangos de biodegradación oscilan entre el 48 al 98 %.

Tabla 2.2 Microorganismos asociados a la biodegradación de HAPs.

Compuesto	Microorganismo asociados	Referencia
Naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo (a) antraceno, criseno, benzo (b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, benzo (a) pireno, indeno (1,2,3 cd) pireno, dibenzo (a, h) antraceno y benzo (g, h, i) perileno	Hongo <i>Phanerochaete velutina</i>	[32]
Fenantreno	Cepas <i>Pseudomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Acidovorax</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> y <i>Nocardia Sphingomonads</i> (compuesto por <i>Sphingomonas</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Sphingopyxis</i> y <i>Novosphingobium</i>)	[77]
Naftaleno, fenantreno, criseno, pireno, y benzo [a] pireno y antraceno	Hongo <i>Trichoderma</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. virens</i> , and <i>T. asperellum</i>	[78]
naftaleno	Sepas <i>Alcaligenes</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Polaromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> , and <i>Streptomyces</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Aeromonas</i> y <i>Bacillus</i>	[69], [79]
Fluoreno	Sepas <i>Arthrobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingomonas</i> y <i>Staphylococcus auriculans DBF63</i>	[69], [79]
Fenantreno	Sepas <i>Acidovorax</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingomonas</i> y <i>Nocardia</i>	[69], [79]
Fluoranteno	Sepas <i>Mycobacterium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Rhodococcus</i> ,	[69], [79]

	<i>Sphingomonas, and Stenotrophomonas y Alcaligenes</i>	
Pireno	<i>Sepas Mycobacterium, Rhodococcus sp, Bacillus cereus, Burkholderia cepacia, Cycloclasticus sp., Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas stutzeri, Sphingomonas sp, Sphingomonas paucimobilis, y Stenotrophomonas maltophilia.</i>	[69]
Benzo [a] pireno	<i>Mycobacterium sp, Sphingomonas paucimobilis, Stenotrophomonas maltophilia, S. maltophilia VUN 10,003, S. paucimobilis EPA 505,</i>	[69]
Antraceno	<i>Pseudomonas, Sphingomonas, Nocardia, Beijerinckia, Rhodococcus and Mycobacterium</i>	[79]

2.2.3.2 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs

Para lograr altas degradaciones de los HAPs, se tienen que tomar en cuenta varios parámetros fisicoquímicos; entre estos se encuentran: el grado de solubilidad, la concentración, la temperatura, y el tiempo de retención hidráulico; adicionalmente, es importante considerar las condiciones más favorables para el desarrollo de los microorganismos, las que se pueden llevar a cabo bajo diferentes condiciones, por ejemplo, metanogénesis, sulfato-reductoras o nitrato-reductoras, entre otras, y no menos importante, pero sí de trascendencia, es conocer el tipo de consorcio con el que se cuenta, el cual puede ser aerobio, anaerobio y/o facultativo. Todos estos factores son de gran importancia para maximizar las condiciones y para obtener altas tasas de biodegradación de compuestos altamente recalcitrantes como los HAPs [79]–[81].

2.2.3.3 Condiciones nitrato-reductoras en la biodegradación de hidrocarburos

La biodegradación anaeróbica es un proceso de gran eficiencia para la remediación de compuestos derivados de los hidrocarburos, principalmente porque la concentración del

oxígeno es menor en los sitios contaminados con hidrocarburos, por lo ello es necesario conocer y evaluar rutas alternativas para la biodegradación y/o la mineralización [82]. El nitrato y el nitrito tienen dos funciones dentro de las vías metabólicas de los microorganismos anaerobios, anaerobios obligados y anaerobios facultativos; que consiste en que funcionan como aceptor de electrones en la respiración anaerobia, además de que funcionan como fuente de nitrógeno para la biosíntesis [83], [84].

La desnitrificación es el proceso de respiración microbiana que se lleva a cabo en bajos niveles o incluso en ausencia de oxígeno, en donde éste es sustituido por el nitrito, que funge como aceptor terminal de electrones durante la mineralización anaerobia de la materia orgánica, siendo transformado en óxido nitroso y en nitrógeno gas; sin embargo, sólo algunas bacterias tiene la capacidad de desarrollar este último paso [85].

El nitrógeno (N) es un elemento que existe de forma abundante en el aire. Se calcula que el 78% de éste se encuentra como N_2 gaseoso, las valencias que tiene este elemento son variadas, siendo las más estables -3 en el amoníaco (NH_3), +3 en el nitrito y +5 en el nitrato (NO_3^-). En la Figura 2.8 se presentan los diferentes estados de oxidación del nitrógeno, que a su vez se asimila por los microorganismos para formar nitrógeno orgánico, que es vital para el desarrollo de los grupos amino, presentes en las proteínas celulares [86].

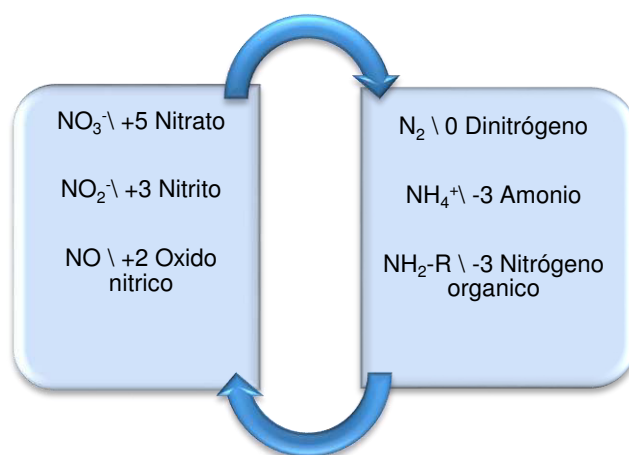
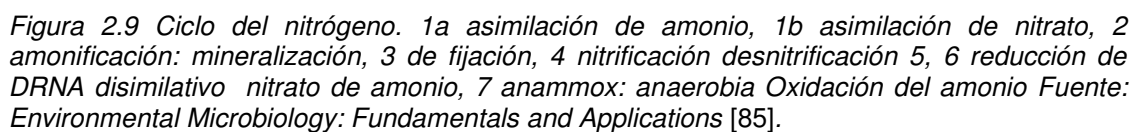


Figura 2.8 Diferentes estados de oxidación del Nitrógeno



Los avances en tecnologías de biorremediación empleando condiciones nitrato-reductoras son considerables, que involucran una gran variedad de microorganismos y se obtienen altos rendimientos de remoción de HAPs [87]–[90]. A su vez, se ha considerado evaluar los efectos que tiene la presencia de oxígeno en microorganismos anaerobios obligados y facultativos reportando beneficios en la asimilación y eliminación de compuestos recalcitrantes y, en otros casos la inhibición del crecimiento [82], [84].

Sin embargo, gran parte de la biodisponibilidad de los compuestos recalcitrantes se limita a las distintas enzimas que los microorganismos sintetizan permitiendo, de esta manera, desarrollar la reducción de nitrato dentro de la célula. Un ejemplo de ésta es la nitrato reductasa periplásmica (NRP), la cual tiene su sitio activo fuera del citoplasma y por lo tanto, no requiere de un mecanismo biológico específico para reducir al nitrato. Por otra parte, las enzimas tienen la capacidad de operar bajo condiciones anaeróbicas facilitando así la respiración de las bacterias y la transformación del nitrato a nitrito [83], [91].

2.2.3.4 Adición de surfactantes y sus efectos

Los surfactantes son compuestos que consisten de una cadena larga de carbón con un extremo hidrofóbico (soluble en agua) y el otro hidrófobo (no soluble en agua), y cuyas moléculas se aglomeran en arreglos organizados conocidos como micelas. La concentración por encima en la que produce este fenómeno se denomina concentración micelar crítica (CMC) que se asociado con el aumento de la concentración del surfactante, provocando que éste tenga arreglos organizados, aunado a cambios en las propiedades del medio acuoso, que influyen significativamente las reacciones químicas [92], [93]. Es debido a esto que la aplicación de los surfactantes es diversa y se ha venido utilizando desde la industria química, la bioquímica y farmacéutica, además de aplicarse en el desarrollo de la flotación de minerales, la dispersión de pinturas entre otras [94]. En la Figura 2.10 se ilustra el arreglo de una micela de surfactante desde la presencia de los monómeros dispersos antes de alcanzar la concentración micelar crítica.

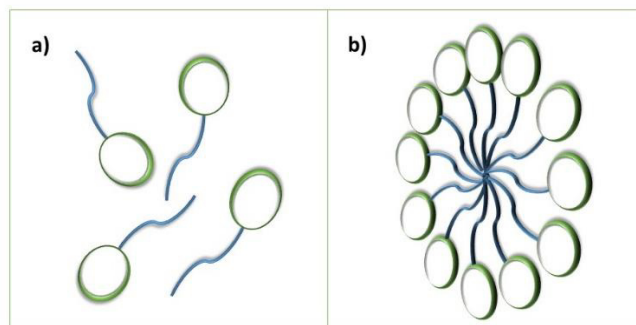


Figura 2.10 a) Monómeros de surfactantes, b) Micela del surfactante

Sin embargo, con el objetivo de aumentar la solubilidad de compuestos recalcitrantes, como son los HAPs, se tienen que tomar en cuenta varios factores, tales como las interacciones que se presentan con el agua, los efectos de su presencia en la biodisponibilidad, la CMC de los dispersantes, entre otras, ya que la cantidad del compuesto que se solubiliza está en función de la estructura del surfactante, la formación de las micelas, la tensión superficial, la composición química del compuesto y la temperatura [95].

Dentro de los avances en el desarrollo de las tecnologías de biorremediación in situ, durante la eliminación de HAPs, se ha propuesto la aplicación de surfactantes en los sitios contaminados, entre los que se encuentran reservas de agua y suelo, obteniendo mejoras significativas en los porcentajes de biorremediación [96]. Es ideal su aplicación en sitios contaminados de difícil acceso, como es el caso del agua subterránea [97].

2.2.3.5 Modelos cinéticos de biodegradación

El estudio y entendimiento de los parámetros cinéticos de biodegradación de compuestos presentes en medios acuosos es de suma importancia para la optimización de los recursos [98], y los tiempos de operación en reactores *batch* y flujo ascendente. Los modelos cinéticos son ecuaciones propuestas para describir cambios y predecir tiempos de remediación de suelos o cuerpos de agua en el estudio de los procesos biológicos, los cuáles se enfocan a proporcionar la variación de las concentraciones de sustratos en función del tiempo.

Sin embargo en la actualidad se siguen usando modelos propuestos en el pasado debido en parte a su relación matemática en el estudio del comportamiento de fenómenos en la naturaleza, obteniendo resultados factibles; Ferdi L. Hellweger [99], ha propuesto que la falta de modelos más complejos para el estudio del medio ambiente y otras disciplinas se debe en parte a que no se cuentan con bases de datos confiables de ciertos fenómenos, pero en gran medida a la falta de financiamiento en proyectos a largo plazo en las diferentes disciplinas aunado al desinterés por parte de modeladores e investigadores, es por ello que el modelo de Monod además de responder a una ley natural sigue vigente y aplicándose a estudios relacionados con microorganismos y medio ambiente.

2.2.3.5.1 Modelo cinético de Monod y su aplicación ambiental

El modelo de Monod fue propuesto en 1942 por J.Monod y ha permanecido vigente por más de 60 años siendo uno de los modelos más empleados en microbiología además de ser empleado en ecología y medio ambiente [37], [99]–[101].El modelo de Monod Ecuación 2.1 describe el crecimiento microbiano con tres parámetros:

- Tasa de crecimiento específico máximo
- Una constante de saturación
- Un coeficiente de rendimiento

En el caso de la cinética de biodegradación, estos parámetros pueden ser utilizados como criterios para el estudio en la biodegradación de contaminantes [100].

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

Ecuación 2.1 Modelo cinético de Monod

Donde:

- μ = Velocidad específica del crecimiento microbiano
- μ_m = Velocidad máxima de crecimiento específico
- S = Concentración del sustrato

- K_S = Saturación del sustrato utilizado

La aplicación del modelo de monod ha sido amplia y diversa en la ecología y biorremediación ambiental; sin embargo existen otros modelos para determinar constantes cinéticas los cuales también han sido empleados en la biorremediación ambiental.

2.2.3.5.2 Los modelos cinéticos de Arvin, bifásico y su aplicación ambiental

Los modelos cinéticos de Arvin y bifásico han tenido aplicaciones en el estudio de la biorremediación ambiental [37], [102], [103]

El modelo bifásico Ecuación 2.2 ha sido aplicado en estudios enfocados en la biodegradación de diésel [37] y BTEOX [103] sin embargo, este modelo de decaimiento no considera la concentración de biomasa presente en los reactores.

$$S_t = S_1 \exp(-K_1 t) + S_2 \exp(-K_2 t)$$

Ecuación 2.2 Modelo bifásico

Donde:

- S_1 = Concentración del sustrato de la primera fase al tiempo cero
- S_2 = Concentración del sustrato de la segunda fase en el tiempo cero
- K_1 = Cinética de la primera fase
- K_2 = Constante de velocidad cinética de segunda fase
- t = Tiempo

El modelo cinético de Arvin fue propuesto por Erick Arvin en 1991. En el que relaciona una constante cinética y, a su vez, el área que corresponde a la biopelícula [104], el modelo de Arvin Ecuación 2.3 está dado por:

$$S_e = \frac{S_i}{1 + K \left(\frac{A}{Q} \right)}$$

Ecuación 2.3 Modelo cinético de Arvin [105]

- S_i = Concentración del influente
- S_e = Concentraciones del efluente
- Q = Caudal
- A = Área de la biopelícula
- K = Constante cinética

La aplicación del modelo de Arvin en la biorremediación ha proporcionado las constantes cinéticas en el estudio de la biodegradación de diésel [102].

Los tres modelos mencionados anteriormente proporcionan información de gran importancia, ya que con ellos se pueden evaluar los porcentajes de remoción y los tiempos de residencia de los contaminantes, siendo de gran importancia en el tratamiento de acuíferos y plantas de tratamiento, desarrollando estrategias de mitigación de bajo costo.

2.2.3.6 Mecanismo de biodegradación anaerobia de fluoreno

El tratamiento anaeróbico de HAPs es un proceso relativamente lento y su bioquímica y mecanismo está en estudio. Sin embargo, los estudios de la degradación de los HAPs como el fenantreno y naftaleno se tienen un mayor desarrollo es por ello que se ha propuesto el mecanismo de descomposición de éstos durante la biodegradación [80].

En condiciones anaeróbicas, los compuestos aromáticos cumplen dos funciones. Por un lado son los sustratos que aportan fuentes de carbón, mientras que por el otro actúan como

donadores de electrones. Una gran variedad de compuestos actúa como aceptores terminales de electrones, sin limitar el crecimiento de los microorganismos [105]. La vía básica de la biotransformación de los HAPs, bajo condiciones anaeróbicas, se muestra en la Figura 2.11.

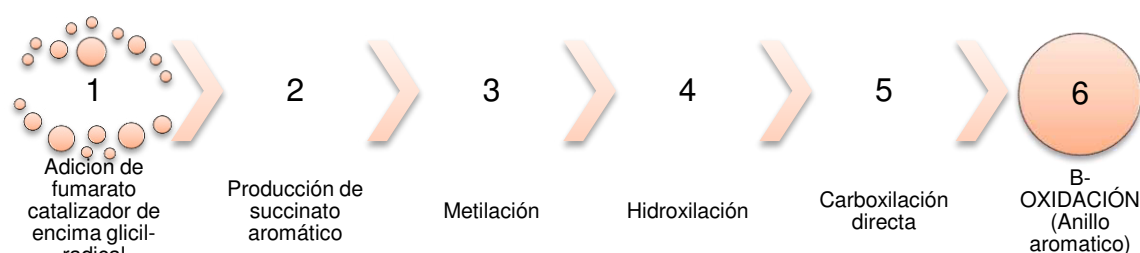


Figura 2.11 Proceso simplificado de la biotransformación de HAPs durante el mecanismo anaerobio Fuente: Shalini Gupta [106].

El fluoreno es un compuesto que se conforma de tres anillos de carbono. De acuerdo con el análisis de la literatura, se sabe que las bacterias de los géneros *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* son capaces de emplear al fluoreno como única fuente de carbono y energía. En la Figura 2.12 se describe el mecanismo de degradación y sus tres principales vías catabólicas reportadas previamente. La transformación del fluoreno inicia con la presencia de 1,2-dioxigenación este a su vez forma fluoreno-1,2-diol que se transforma adicionalmente en 3-Cromanona a través de ácido 2 - hidroxí - 4- (2 - oxo - indan - 1 - ilideno) - 2 - butenoico, 1 - formil - 2 - indanona, Indanona - 1 - carboxílico y 2 - indanona. La segunda vía comienza en un principio 3,4-Dioxigenación de fluoreno que conduce a la formación de salicilato a través de 2 - hidroxí - 4- (1 - oxo - indan-2-Ilideno) - 2 - butenoico, 2 - formil - 1 - indanona, ácido 1 - indanona - 2 - carboxílico, 1 - indanona, Cromanona y ácido 3- (2-hidroxí-fenil) –propiónico. La tercera vía se genera solo si se produce una posterior oxidación de carbono angular, dando lugar a la formación de ftalato que se transforma adicionalmente en un protocatequito [69].

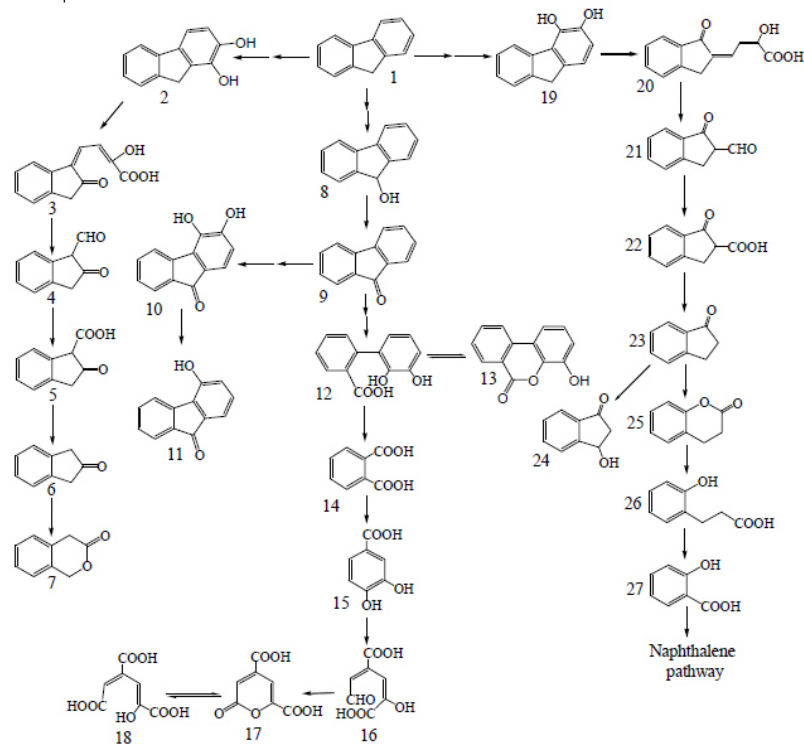


Figura 2.12 Diferentes rutas de descomposición de fluoreno por biodegradación anaerobia [69]

2.2.3.7 Consideraciones generales en reactores de biopelículas

La aplicación de diferentes procesos, tanto aerobios como anaerobios, para la eliminación de compuestos orgánicos en agua residual ha sido variada, sin embargo, la implementación de reactores de lecho empacado, o reactores que incorporan diferentes materiales para el crecimiento de la biopelícula [106] se ha venido estudiando. Para capturar y retener eficazmente la biomasa activa dentro del reactor es de suma importancia establecer el material que brindará soporte, ya que es un factor crítico que influye en el rendimiento y la robustez del reactor [107], la implementación de reactores de biopelícula ha demostrado gran eficiencia en la remoción de compuestos simples y compuestos recalcitrantes, como son los HAPs [108].

Sin embargo, para la implementación de un reactor de biopelícula fija no sólo es necesario considerar el material de empaquetamiento sino también se debe de considerar y monitorear

parámetros tales como el pH, la alcalinidad, DQO, DBO₅ entre otros. Las condiciones de operación y actividad de las comunidades microbianas es influenciado por la interdependencia de las especies presentes, por lo que responden a cambios repentinos y cualquier estrés impuesto puede conducir a cambios en la comunidad y su actividad [109]. Otro de los factores que afecta a las comunidades microbianas en el crecimiento de las especies ha sido estudiado por W. Qin y col. [110], estableciendo que la biodegradación anaerobia del Benzo [a] pireno se ve influenciada por la concentración de nitrato y nitrito, que son los aceptores de electrones.

La implementación de las biopelículas o reactores de lecho empacado con biopelículas han sido probados con éxito en la biorremediación y también se ha probado que acorta los tiempos de residencia para altas tasas de eliminación, tanto para diésel [102] como para los HAPs [108], [111].

Capítulo 3 Metodología Experimental

3.1 Introducción al desarrollo experimental: Perspectiva General

El estudio de la biodegradación de cualquier compuesto por lo general consiste en una serie de pasos que incluyen desde la medición de los parámetros de control hasta la evaluación de los productos y subproductos obtenidos durante el proceso.

Los parámetros que fueron medidos durante el desarrollo del proyecto son los siguientes:

- Oxígeno Disuelto (OD)
- Potencial Óxido Reducción (ORP) por sus siglas en ingles
- pH
- Masa Celular Volátil (MCV)
- Concentración Micelar Crítica (CMC)
- Espesor de la biopelícula en el RFA
- DBO₅ y DQO
- Concentración de fluoreno inicial y final
- Temperatura (T)

El estudio de biodegradación se desarrolló aplicando dos sistemas: el primero consistió en pruebas *batch* las cuales se desarrollaron por triplicado, con un control para cuantificar la pérdida abiótica, por otra parte, el segundo sistema consistió en el estudio de biodegradación en un Reactor de Flujo Ascendente (RFA) con siete puertos de muestreo empacado con roca tezontle. La concentración inicial y final de fluoreno fue determinada por cromatografía de gases.

En los siguientes apartados se explica de forma detallada las técnicas y procedimientos que se aplicaron durante el estudio. Cabe señalar que las determinaciones relacionadas con OD, ORP, pH, Temperatura y el seguimiento de biodegradación fueron determinados y medidos tanto para las pruebas *batch* como también para el RFA. La CMC y la MCV se determinaron para ambos estudios (*Batch* y RFA). La primera fue para conocer la cantidad de surfactante necesaria para lograr la completa dispersión de fluoreno, mientras que la segunda es necesaria para conocer la concentración de biomasa que se encuentra presente en los reactores durante la biodegradación, así como el espesor de la biopelícula en el caso del RFA. Para las pruebas en *batch* se evaluó al inicio del experimento, mientras que en el RFA se midió al final de las pruebas

de biodegradación. En el caso de la determinación de la DBO₅ y DQO, estas se llevaron a cabo en las muestras de influente y efluentes del RFA, por otra parte, para la determinación de las constantes de biodegradación en el RFA se consideraron dos diferentes modelos cinéticos, el modelo bifásico y el modelo de Monod, mientras que para las pruebas en reactores *batch* se utilizó un modelo de primer orden. Finalmente, en este capítulo también se mencionan las consideraciones termodinámicas de la biodegradación de fluoreno bajo desnitrificación. A continuación se muestra de manera detallada los procedimientos mencionados anteriormente.

3.2 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) del GAELE

Como ya se ha mencionado anteriormente (Capítulo 1 y 2), la adición de surfactantes mejora la biodisponibilidad de los contaminantes. Sin embargo, es necesario conocer los valores reales de la CMC, el surfactante empleado durante el desarrollo de esta tesis fue el GAELE por sus siglas en inglés (Ácido glicólico etoxilato lauril eter), esta concentración fue empleada para ambos experimentos tanto *batch* como RFA. Para determinar este parámetro fue necesario realizar la disolución del GAELE en el medio nitrato-reductor a diferentes concentraciones de 0 a 10,000 ppm, para posteriormente determinar su densidad (ecuación 3.1). Para aplicar esta ecuación fue necesario evaluar la variación del peso en 10 ml de las diluciones preparadas anteriormente.

$$\rho = \frac{Masa\ (gr)}{Volumen\ (cm^3)}$$

Ecuación 3.1 Determinación de la Densidad ρ (gr.cm⁻³)

Una vez calculada la densidad, se desarrolló la determinación del cambio de la tensión superficial la cual fue desarrollada con la ecuación 3.2 la cual consiste en determinar el diferencial de alturas de un capilar considerando el radio de éste y la densidad del medio con el surfactante.

$$\sigma = \frac{h * g * r * \rho}{2}$$

Ecuación 3.2 Determinación del cambio de la tensión superficial de un fluido (dina.cm⁻¹)

Donde:

- h= Altura de la columna líquida dentro del capilar (cm)
- g= Aceleración debida a la gravedad (cm.s⁻²)
- r= Radio del capilar (cm)
- ρ = Densidad del líquido (gr.cm⁻³)

3.3 Medio de cultivo nitrato reductor

Las condiciones en las que se desarrolló la biomasa consistieron en una adición específica de surfactante GAELE en un medio rico en nitratos [112], el cual se detalla en la Tabla 3.1 estas concentraciones de sales se aplicaron para ambos experimentos tanto *batch* y RFA.

Tabla 3.1 Medio nitrato-reductor

Reactivo	Cantidad (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	2.0
K ₂ HPO ₄	3.5
NaNO ₃	1.0
Acetato de Sodio	1.5
NH ₄ NO ₃	0.5
MgCl ₂	0.5
Glicerol	0.5
Tryptona	1.0
Extracto de levadura	1.0

Para fines de conservación y eliminación de cualquier microorganismo, el medio fue esterilizado a 15 psi y 121 °C durante 15 minutos, una vez esterilizado se adicionó 1 ml del stock de nutrientes con la composición que se describe en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Composición stock de nutrientes

Reactivo	Cantidad (g.L⁻¹)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.36
Na ₂ MoO ₄	0.20
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.58
Co(NH ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.29
NiSO ₄ ·H ₂ O	0.13
H ₃ BO ₃	0.062
Na ₂ SeO ₃	0.035
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.017
NaHCO ₃	0.042
CaCl ₂	0.025
H ₂ SO ₄ Concentrado	1.0 mL

Buscando promover la aclimatación del consorcio del RFA a fluoreno, fue necesario alimentar el reactor dos veces por semana con un litro del medio nitrato reductor variando la concentración de fluoreno paulatinamente. Los tres primeros meses se suministraron 100 mg·L⁻¹ de fluoreno, seguido de 200 mg·L⁻¹ los siguientes tres meses, siendo 250 mg·L⁻¹ la concentración final suministrada. Una vez alcanzada esta concentración, se siguió alimentando con la misma durante el resto del proyecto de tesis.

3.4 Obtención del consorcio microbiano

Los microorganismos empleados fueron separados de un consorcio que había sido mantenido en un sustrato, donde su única fuente de carbono por más de cinco años ha sido diésel comercial. La caracterización del consorcio fue reportada en un trabajo previo, enfocado en la

biodegradación de diésel [102]. Sin embargo, para este estudio estas especies fueron adaptadas a la biodegradación de fluoreno.

Dicho consorcio fue tomado del sustrato acuoso con presencia de diésel por lo que fue necesario concentrarlo previamente por medio de la técnica de centrifugación con el equipo marca Beckman Coulter modelo Allegra X-22R a 4000 rpm durante 20 min. Para ello, fue necesario aplicar este procedimiento utilizando viales falcon de 50 ml hasta centrifugar la cantidad total de dos litros del sustrato, del cual se separó la biomasa depositada en el fondo de los tubos, para su posterior prueba en los reactores *batch*; parte de esta biomasa se destinó para promover su crecimiento en el RFA.

3.5 Evaluación de parámetros

Como ya se mencionó en el apartado 3.1, para ambos estudios tanto *batch* como RFA, fue necesario seguir la evaluación de parámetros de importancia los cuales se describen a continuación:

- Tiempo de retención
- Potencial de Óxido Reducción (ORP) y pH,
- Oxígeno Disuelto (OD)
- Asimilación de nitratos
- Masa Celular Volátil Reactores *batch* y RFA

3.5.1 Tiempo de Retención Hidráulico (TRH)

El tiempo de retención elegido para la determinación de estos parámetros fue de 1.25 horas, debido a que ofrece un tiempo de residencia mayor y un mayor contacto con la biopelícula; por lo que los resultados obtenidos ofrecen una mayor confiabilidad y aportan información más completa sobre el comportamiento de los parámetros.

3.5.2 Potencial Óxido Reducción (ORP) y pH

La evaluación del ORP y pH se desarrolló para ambos estudios tanto *batch* como RFA. Estos parámetros fueron medidos con el equipo Hannapro, S.A. de C.V. modelo HI 98150. Para las pruebas en *batch* se midió inicialmente y a los 60 días, tomando una muestra de 20 mL de los viales. Las mediciones para el RFA se desarrollaron, para todas las concentraciones de fluoreno suministradas al reactor, tomando 30 mL de muestra del influente y efluente a un TRH de 1.25 h.

3.5.3 Oxígeno Disuelto (OD)

La determinación de este parámetro se desarrolló simultáneamente con la determinación de ORP y pH en las mismas muestras, solo que utilizando un equipo Hannapro, S.A. de C.V. modelo HI 9143, para las pruebas en *batch* se midió inicialmente y a los 60 días tomando una muestra de 20 mL de los viales. Las mediciones para el RFA se desarrollaron para todas las concentraciones de fluoreno suministradas al reactor, tomando 30 mL muestra del influente y efluente.

3.5.4 Asimilación de nitratos

Para conocer si se desarrolló la asimilación de los nitratos del medio de cultivo una vez mezclado con el consorcio, fue necesario emplear la prueba de reducción de nitratos Fluka Sigma aldrich [113]. Cabe señalar que esta determinación se desarrolló a un TRH de 0.75 h ya que se puede deducir que si el consorcio desarrolla la asimilación de los nitratos a este tiempo con el TRH de 1.25 h se presentaría el mismo comportamiento. La prueba fluka consta de los siguientes reactivos:

- Caldo de nitratos
 - *Peptona 5 g / l*
 - *Extracto de carne 3 g / l*
 - *Nitrato de potasio 1 g / l*
 - *PH final 7.0 ± 0.2 a 25°C*
- Ácido sulfanílico
- N, N-dimetil-1-naftilamina
- Zinc

En principio, el nitrato presente en el caldo se reduce a nitrito, que a su vez puede reducirse a óxido nítrico, óxido nitroso o nitrógeno, esta reducción del ion nitrito no presenta coloración una vez mezclados ambos reactivos en el caldo de nitratos, lo que sugiere que la reducción del nitrito es completa por parte del consorcio.

Esta prueba es netamente cualitativa, ya que identifica la reducción del ion nitrato a nitrito, a través de una coloración rosa provocada por la presencia de nitrito y su capacidad para formar un compuesto rojo cuando reacciona con el ácido sulfanílico, debido a la formación de un complejo (ácido nitrito sulfanílico) que reacciona con una α -Naftilamina para dar un precipitado rojo (prontosil) [113]. Para confirmar que no exista un remanente del nitrato se adiciona zinc en polvo el cual funge como catalizador en la reducción de nitrato a nitrito.

Un color rojo se producirá en el medio sólo cuando el nitrito esté presente en el medio. La falta de un color rojo en el medio después de la adición de ácido sulfanílico y α -naftilamina significa sólo que el nitrito no está presente en el medio.

Para desarrollar la prueba fue necesario preparar los reactivos como se describe a continuación:

Solución A, consistió en la disolución de 0.5 g de ácido sulfanílico en 100 mL de ácido acético 5 N. Posteriormente se preparó la solución B, la cual consistió en 0.5 mL de N-N- dimetil-1-naftilamina aforados en 100 mL de ácido acético 5N, por último para la elaboración de un caldo nitrato reductor se pesaron 1.28 g y se disolvieron en 120 mL de agua destilada. La preparación de reactivos fue la misma para la determinación de las muestras de los reactores *batch* y RFA.

Una vez preparados los reactivos, se midieron 10 mL del caldo nitrato reductor y se adicionaron en tubos de ensaye con rosca, los cuales se sometieron a esterilización en autoclave a 121 °C 15 psi durante un periodo de 15 minutos. Ya que los tubos alcanzaron la temperatura ambiente, se adicionó 1mL de las muestras de los reactores *batch* ó RFA, se cerraron los tubos y se dejaron en incubación durante un periodo de 48 horas, trascurrido este tiempo se añadieron seis gotas de la solución A y seis gotas de la solución B dejando reaccionar durante 15 minutos, de no observarse el cambio de color se añade el catalizador para confirmar si existió la reducción del nitrato por completo.

El muestreo para las pruebas en *batch* se desarrolló tomando muestras por triplicado de los reactores a los 60 días tomando un mL de cada reactor, tanto del control como de las muestras que contenían 200 mg.L⁻¹ de fluoreno en presencia del consorcio; por otra parte, para la evaluación de reducción de nitratos en el reactor de flujo ascendente fue necesaria la toma de muestras del influente, puerto 1, puerto 6 y efluente (puerto 7) con el fin de conocer desde que punto se presenta la reducción completa del ion NO₃⁻, esta determinación solo se desarrolló para la concentración de 250 mg.L⁻¹ en el RFA asumiendo un comportamiento similar en las otras concentraciones.

3.5.5 Determinación de la masa celular volátil reactores *batch*

El desarrollo del cálculo de la concentración de biomasa que fue empleada en los reactores *batch* se desarrolló siguiendo la metodología establecida por el método estándar 2540 [114], la cual consiste en los siguientes seis pasos:

Tara del papel filtro.

Para determinar la masa celular fue necesario llevar a peso constante el papel filtro Waltmant 934-AH sometiendo el papel a calentamiento a 105 °C en una estufa marca Thermo scientific Mod. Linberg/Blue M durante 20 minutos y posteriormente se mantuvo en reposo en un desecador durante 10 minutos, para posteriormente pesar y registrar su peso, este procedimiento se repitió hasta obtener un peso constante del papel.

Dilución del concentrado.

A su vez se desarrolló la dilución de 3 mL del concentrado de biomasa en 10 mL de agua destilada, con el fin de homogenizar la biomasa utilizando una placa de agitación marca VWR modelo Advanced 250 a temperatura ambiente y una agitación de 200 rpm.

Filtrado del concentrado.

Posteriormente a la dilución se sometió a filtración los 10 mL de la mezcla obtenidos anteriormente utilizando el papel filtro y haciendo vacío con una bomba marca Millipore Mod. WP-6111580 durante 45 minutos para remover la mayor cantidad de agua presente y retener toda la biomasa en el filtro.

Secado.

Una vez filtrada la biomasa, el siguiente paso consistió en el secado a 105°C del papel en una estufa marca Thermo scientific Mod. Linberg/Blue M permaneciendo durante 20 minutos en la estufa y 10 minutos en el desecador para posteriormente pesar y registrar su peso este procedimiento se repitió hasta obtener un peso constante.

Calcinación de la materia orgánica.

Finalmente se calcinó el papel a 550 °C en una mufla marca Barnstead|Thermolyne Corporation Modelo 1300 durante 20 minutos y posteriormente se dejó 10 minutos en el desecador para tomar la lectura del peso final, este procedimiento se repitió hasta tener el peso constante.

Cálculo de la MCV.

El cálculo para determinar la masa celular presente en el consorcio se realizó por medio de la Ecuación 3.3, donde

- A= La diferencia de los pesos del papel seco a 105 °C una vez filtrada la biomasa.
- B= El peso correspondiente del papel calcinado a 550 °C.

$$mg \text{ de masa celular} = (A - B \text{ en mg}) \times 1000 / Vol. muestra \text{ ml}$$

Ecuación 3.3 Determinación de la masa celular volátil.

3.5.6 Determinación de la masa celular volátil y espesor de la biopelícula en el RFA

Determinación de la masa celular volátil RFA

La determinación de la masa celular volátil se realizó un vez concluidos los ensayos cinéticos, la masa celular presente dentro del reactor se determinó por segmentos y se expresó en términos de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), siguiendo la metodología que se describe a continuación:

Para desarrollar esta determinación fue necesario vaciar el medio nitrato-reductor presente en el reactor. Buscando facilitar la identificación del reactor los segmentos se identificaron del uno al seis de abajo hacia arriba en función de la altura de puerto. Se separó el contenido de roca tezontle presente en cada segmento para posteriormente pesar y cuantificar la cantidad que estaba contenida dentro del reactor; establecido lo anterior se separó una cuarta parte de cada segmento con el fin de desarrollar las determinaciones tanto de SSV como el espesor de la biopelícula. Una vez hechas las determinaciones se realizó la multiplicación del resultado por cuatro para así obtener el valor relacionado por segmento.

Secado de la roca

Habiendo separado la cuarta parte del material de soporte de cada segmento se procedió a registrar su peso húmedo para después secar el material a 105 °C en una estufa marca Thermo scientific Mod. Linberg/Blue M permaneciendo durante 20 minutos en la estufa y 10 minutos en el desecador y posteriormente pesar y registrar su peso seco; este procedimiento se repitió hasta obtener un peso constante.

Calcinación de la roca

Finalmente se calcinó la roca de cada segmento a 550 °C en una mufla marca Barnstead|Thermolyne Corporation Modelo 1300, durante 20 minutos y posteriormente se dejó 10 minutos en el desecador para tomar la lectura del peso final; este procedimiento se repitió hasta tener el peso constante.

Cálculo de la MCV en el RFA

El cálculo para determinar la masa celular presente en cada segmento del reactor se realizó por el diferencial de peso seco y el peso calcinado Ecuación 3.4, una vez obtenida la diferencia se multiplicó por cuatro para obtener la cantidad de biomasa presente en cada segmento

- A= La diferencia de los pesos de la roca seca de cada segmento a 105 °C
- B= El peso correspondiente a la roca calcinada de cada segmento calcinado a 550 °C.

$$\text{Peso del segmento (g)} = (A - B \text{ en g}) * 4$$

Ecuación 3.4 Determinación de masa celular volátil RFA.

Determinación del grosor de biopelícula RFA

Para determinar el grosor de la biopelícula se utilizó el método gravimétrico y la Ecuación 3.5:

$$L_{X\ 1-6} = \frac{(W_{w\ 1-6} - W_{d\ 1-6})}{[(S_{1-6}) (\delta)]}$$

Ecuación 3.5 Determinación del grosor de biopelícula RFA

Donde:

- $L_{X\ 1-6}$ corresponde al grosor de la biopelícula y es indistinto para cualquier segmento del reactor.
- $W_{w\ 1-6}$ el peso húmedo de biomasa crecida sobre la roca volcánica.
- $W_{d\ 1-6}$ el peso seco de biomasa crecida sobre la roca volcánica.
- S_{1-6} corresponde al área superficial de la roca volcánica de todos los segmentos del reactor.
- δ densidad del agua en g/cm³.

Finalmente para determinar el área superficial de los segmentos se realizó la suposición de que las piedras tezontles tienen una forma esférica para todos los segmentos, esta suposición ya ha sido reportada previamente para desarrollar esta determinación[37].

3.5.6 Determinación de la biodegradación en los reactores *batch*

El desarrollo de las pruebas en *batch* se llevó a cabo utilizando el medio nitrato-reductor mencionado anteriormente mezclado con una concentración de 100 μL del surfactante GAELE; para estos ensayos se agregaron 200 mg.L^{-1} de fluoreno el cual fue disuelto en 3 mL de tolueno (HPLC) ,Sigma Aldrich, INC., en un tubo de ensaye el cual fue agitado utilizando un equipo modelo Vortex Genie 2t marca Scientific Industries, Inc.

Para determinar el comportamiento de biodegradación en los reactores *batch* se tomaron 27 mL del medio combinado con el fluoreno, para ser mezclados con tres mL del concentrado de biomasa y puestos en un vial de 124 mL, a su vez se tomaron 30 mL de medio el cual fue puesto en un vial de 124 mL mezclado con 2 mL de ácido fosfórico concentrado marca CTR S.A de C.V para el estudio de la pérdida abiótica, este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las fechas de muestreo que fueron a los 0, 20, 40, 60, 80 días.

Para la determinación del contenido de fluoreno, una vez transcurrida la fecha de muestreo, se tomaron alícuotas de 6 mL de cada vial utilizando jeringas serológicas Terumo® de 10 mL. Estas alícuotas fueron mezcladas con 2 mL de diclorometano marca CTR S.A de C.V grado HPLC el cual funge como agente extractor en un vial marca Supelco- Sigma Aldrich, INC de 8 mL con septa. Una vez mezclados se agitó durante 3 minutos en el equipo modelo Vortex Genie 2t marca Scientific Industries, Inc, y posteriormente se dejó reposando en una placa de calentamiento marca Barnstead|Thermolyne Corporation Modelo CIMAREC a 80 °C durante 2 minutos con el fin de separar las fases de diclorometano y el medio nitrato-reductor para su posterior análisis por cromatografía de gases.

La determinación del contenido de fluoreno se desarrolló por cromatografía de gases tomando una muestra de 0.2 μL del diclorometano del procedimiento anterior inyectando en el cromatógrafo marca Varian modelo 3400 equipado con un Detector de Ionización de Flama (FID) por sus siglas en inglés, el cual cuenta con un columna capilar marca J&W (Supelco, Bellefonte, PA INC.) Modelo DB-5 de 30 m \times 0.25 mm \times 0.5 μm de película de silica las condiciones de operación del análisis se describen a continuación:

- La temperatura del inyector se mantuvo constante a 230 °C.
- La temperatura del detector se mantuvo constante a 250°C con una atenuación de 8 y un rango de 12 mV.
- La rampa de calentamiento de la columna inició a una temperatura de 100 °C manteniendo constante esta temperatura durante un minuto, posteriormente se incrementó la temperatura utilizando una rampa de calentamiento de 2 °C.min⁻¹ hasta alcanzar una temperatura de 104 °C, seguido de un incremento de 3.33 °C. min⁻¹ hasta alcanzar una temperatura de 220 °C, el tiempo total de ejecución del programa fue de 18.60 min.

Una vez establecidas las condiciones de análisis del cromatógrafo se procedió al desarrollo de una curva de calibración empleando alícuotas del stock de fluoreno representativas a las concentraciones de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 ppm.

Partiendo de una solución stock de 50 000 ppm de fluoreno, se tomaron alícuotas de 30, 20, 10, 5, 2 y 1 µL con una jeringa marca Hamilton® de 100 µL, las cuales fueron disueltas en un mL de diclorometano utilizando un vial de 4 mL marca Supelco-Sigma Aldrich, INC una vez mezclados los estándares con el diclorometano se tomaron 2 µL con una microjeringa Hamilton® de 10 µL para su inyección en el cromatógrafo de gases iniciando con la concentración más baja y finalizando con la más alta, con lo datos obtenidos se realizó la curva de calibración aplicando el método de mínimos cuadrados.

3.5.7 Determinación de la biodegradación en el RFA

3.5.7.1 Montaje y operación del RFA

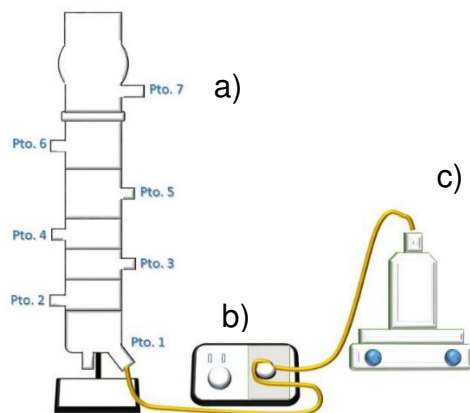


Figura 3.1 a) Reactor de flujo ascendente b) Bomba peristáltica c) Placa de agitación y matraz con medio de cultivo.

El reactor empleado para el desarrollo del proyecto consta de 7 puertos de muestreo separados por las distancias de 0, 5.08, 10.16, 17.78, 27.94, 43.18, 55.88 cm en orden ascendente, el material con el que fue empacado fue roca volcánica (Tezontle), con diferentes diámetros de 0.1, 0.3 y 0.5 cm, parte de la biomasa separada previamente se utilizó para que creciera dentro del reactor. La forma en la que se suministró el medio nitrato-reductor mezclado con fluoreno para el crecimiento, alimentación y desarrollo de los ensayos cinéticos fue a través de una bomba peristáltica Control® (Control Company, Texas USA) como se ilustra en la figura 3.1

Para el estudio cinético se emplearon dos Tiempos de Retención Hidráulicos (TRH), las velocidades de los flujos fueron de 8 y 5 mL.min⁻¹ obteniendo los THR de 0.75 y 1.25 horas, considerando el volumen muerto del reactor que es de 360 mL.

3.5.7.2 Determinación de biodegradación en RFA y sus condiciones

El estudio cinético de biodegradación de fluoreno se llevó a cabo utilizando dos diferentes TRH, el primero de 0.75 alimentando las concentraciones de 100, 150, 200, 250, 300, 350 mg.L⁻¹, una vez transcurrido el tiempo de alimentación al reactor con un flujo de 8 mL.min⁻¹ se tomaron 6 mL de muestra de cada uno de los 7 puertos con jeringas serológicas Terumo® de 10 mL, siendo mezclados con 2 mL de diclorometano marca CTR S.A de C.V grado HPLC el cual es el agente extractor una vez realizada la mezcla se agitó durante 3 minutos en el equipo modelo Vortex Genie 2t marca Scientific Industries, Inc, posteriormente se dejó reposando en una placa de calentamiento marca Barnstead|Thermolyne Corporation Modelo CIMAREC a 80 °C durante 2 minutos con el fin de separar las fases de diclorometano y medio nitrato-reductor.

Una vez separadas las fases se extrajo la fase de interés por medio de una jeringa marca Hamilton®, y posteriormente se inyectaron 0.2 µL de la muestra realizando este procedimiento en cada puerto para su posterior análisis por cromatografía de gases, bajo las condiciones que se mencionan en el apartado 3.5.5. Este mismo procedimiento se aplicó para las determinaciones que se desarrollaron para el TRH de 1.25 h.

3.5.7.3 Determinación de DQO y DBO₅

La determinación de la DQO y DBO₅ han sido establecidos a nivel mundial como parámetros para medir la calidad del agua y evaluar los contaminantes orgánicos presentes tanto en medios acuáticos como en el diseño de plantas de tratamiento de aguas residuales [115], para desarrollar el análisis de DBO₅ se requieren 5 días de incubación con microorganismos y la medición del oxígeno disuelto durante la oxidación bioquímica de la materia orgánica. En condiciones normales, los microorganismos oxidan los residuos orgánicos para obtener energía, sintetizando durante el proceso moléculas complejas tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos [116], mientras que la DQO requiere sólo unas pocas horas para obtener su resultado final el cual está relacionado con el consumo de oxígeno químico de acuerdo con la concentración de materia orgánica [117].

En México las normas oficiales mexicanas que determinan los límites permisibles de descarga de DBO₅ son la NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de

contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. El límite máximo permisible está en función del cuerpo receptor del agua y/o su uso final pero el rango oscila entre los 200 a 30 de DBO₅ los mismos parámetros aplican para la NOM-002-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal [118], sin embargo, sabes que la carga orgánica de las aguas residuales están en función de la fuente de emisión.

Por otro lado, las tendencias a nivel global sobre las normas para la medición de los índices de contaminación de efluentes no solo establecerán a la DQO y DBO₅ sino también se encaminan a la medición de contaminantes tóxicos prioritarios de manera individual [119] sin embargo, sigue siendo un parámetro con el cual se puede cuantificar la cantidad de carga orgánica removida una vez aplicado un tratamiento biológico. Los procedimientos establecidos para estas determinaciones son los Standard Methods 5210 y 5220 [120], estos se aplicaron a las muestras de influentes y efluentes del RFA alimentando concentraciones diferentes de 100, 200 y 350 mg.L⁻¹ y una cuarta la cual consistió del medio nitrato-reductor con 100 µL de GAELE el cual es considerado como el blanco; el TRH fue de 1.25 h para todas las concentraciones, ya que con una mayor residencia dentro del reactor del medio en presencia del contaminante se puede establecer la tasa máxima de reducción de ambos parámetros para estos ensayos.

3.5.8 Cálculo de las constantes cinéticas reactores *batch*

Una vez realizados los ensayos de biodegradación para las pruebas *batch* y sus determinaciones por cromatografía de gases, se calculó la constante cinética de biodegradación empleando el modelo cinético de primer orden ecuación 3.6 modelado en el programa Sigmaplot®, Systat Software, Inc.

$$C = C_0 e^{-kt}$$

Ecuación 3.6 Modelo cinético de primer orden

Donde:

- C = Concentración del sustrato con respecto al tiempo (mg.L^{-1})
- C_0 = Concentración inicial (mg.L^{-1})
- k = constante cinética
- t = tiempo en días

3.5.9 Cálculo de las constantes cinéticas RFA

La determinación de las constantes de biodegradación para ambos TRH 0.75 y 1.25 h, se desarrolló una vez obtenidos los resultados de las determinaciones analíticas de la cromatografía de gases de cada una de las concentraciones suministradas al RFA, utilizando el programa Sigmaplot®, Systat Software, Inc. para cada modelo.

El primer modelo cinético que se empleó para determinar las constantes cinéticas fue el modelo de decaimiento de cuatro parámetros o modelo bifásico como se muestra en la Ecuación 3.7.

$$S_t = S_1 e^{-k_{01}t} + S_2 e^{-k_{02}t}$$

Ecuación 3.7 Modelo bifásico

Donde:

- S_t = Concentración del sustrato con respecto al tiempo (mg.L^{-1})
- S_1 = Concentración del sustrato en el tiempo cero de la fase rápida (mg.L^{-1})
- S_2 = Concentración del sustrato en el tiempo cero de la fase lenta (mg.L^{-1})
- k_{01} y k_{02} = Las constantes de velocidad de las fases rápida y lenta respectivamente (h^{-1})
- t = Altura del reactor (cm)

El segundo modelo empleado es el modelo de Arvin, el cual proporciona las constantes de máxima utilización de cada concentración. Este modelo se caracteriza por considerar el área de la biopelícula y el caudal del reactor. Como ya se ha mencionado, para las pruebas en el RFA se alimentó al reactor con dos TRH diferentes 0.75 y 1.25 h siendo los caudales de 480 y

288 (cm³.h⁻¹) respectivamente considerando el volumen muerto del reactor de 360 mL. El modelo de Arvin está dado por la ecuación 3.8:

$$S_e = \frac{S_i}{1 + K \left(\frac{A}{Q} \right)}$$

Ecuación 3.8 Modelo cinético de Arvin [105]

- S_i= Concentración del influente (mg.L⁻¹)
- S_e= Concentraciones del efluente (mg.L⁻¹)
- Q= Caudal (cm³.h⁻¹)
- A= Área de la biopelícula (cm²)
- K= Constante cinética (h⁻¹)

Se obtuvieron dos constantes cinéticas para cada concentración a partir del modelo de Arvin.

- K_{max} =Constante máxima de utilización, se determinó considerando que el comportamiento de la relación S_i/S_e vs masa acumulativa del reactor determinada a cada segmento (SSV) fue lineal. Se aplicó el modelo de regresión lineal y en aquellas concentraciones en las que no se presentó linealidad en las constantes de máxima utilización, se determinó a partir de donde se presenta la mayor pendiente creciente con respecto al eje x.
- K_{vel iniciales} = Constantes de velocidades iniciales, es aquella en la que se consideran solo los cuatro primeros puertos, ya que se no se presenta linealidad considerando todos los puertos del reactor.

Una vez obtenida la constante máxima de saturación de Arvin se procedió a determinar el modelo cinético de Monod utilizando la ecuación 3.9, el cual proporcionó la velocidad máxima saturación del reactor y la saturación media del fluoreno.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

Ecuación 3.9 Modelo cinético de Monod

Donde:

- μ = Velocidad específica de biodegradación (h^{-1})
- μ_{max} = Velocidad máxima saturación del reactor (h^{-1})
- S = Se refiere a la concentración del sustrato (mg.L^{-1})
- K_S = Constante de saturación media (mg.L^{-1})

Una vez determinadas las constantes por ambos modelos cinéticos, se realizó un comparativo de ambas ya que el modelo bifásico no considera la concentración de la biomasa presente, mientras que el modelo de monod si lo considera buscando identificar si existen cambios en las constantes al considerar este parámetro.

3.5.10 Cálculos termodinámicos

La energía libre de Gibbs teórica se determinó para la biodegradación de fluoreno bajo condiciones nitrato-reductoras, basado en la energía estándar de los productos y reactivos de acuerdo a la ecuación 3.9.

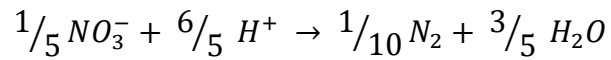
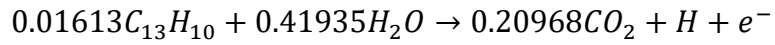
$$\Delta G^0 = \Delta G_f^0 \text{ Productos} - \Delta G_f^0 \text{ Reactivos}$$

Ecuación 3.10 Energía libre de Gibbs estándar

Donde:

- ΔG^0 = Energía libre de Gibbs estándar
- ΔG_f^0 = Energía de formación estándar de Gibbs de los productos
- ΔG_f^0 = Energía de formación estándar de Gibbs de los reactivos

Considerando la entalpia y la entropía bajo condiciones estándar de formación y la consideración teórica de una mol.L^{-1} , la presión parcial a 1 atm. Las consideraciones biológicas fueron $\text{pH}=7$ para el sustrato y condiciones de nitrato reducción.



Ecuación 3.11 Balance estequiométrico de la mineralización del fluoreno bajo condiciones nitrato-reductoras

El cálculo termodinámico se basó en el balance estequiométrico mencionado anteriormente bajo condiciones de nitrato-reducción por parte del consorcio y que se obtiene una mineralización completa del fluoreno.

Capítulo 4 Resultados y discusiones

4.1 Concentración micelar crítica (CMC) del GAELE

El establecer la cantidad de surfactante es indispensable para obtener una dispersión homogénea. Un parámetro que ya se ha mencionado en los capítulos previos es la CMC, la cual está en función de la concentración el peso molecular del surfactante y las condiciones en las que se desarrolle el estudio [96]. La aplicación de surfactantes para la dispersión de HAPs se ha estudiado previamente [95], [121], [122]; sin embargo, la aplicación del surfactante GAELE no se ha reportado para la dispersión del fluoreno, es por ello que fue necesario desarrollar el estudio para determinar la CMC bajo las condiciones de experimentación llevadas a cabo en este trabajo, las cuales son:

- Medio nitrato-reductor
- Diferentes concentraciones de fluoreno 100,150, 200, 250, 300, 350 mg.L⁻¹
- Presencia del consorcio (biomasa)

Los resultados obtenidos por el método diferencial de alturas de capilar establecen un cambio en el comportamiento de la tensión superficial en el intervalo de concentraciones de 100 a 500 ppm. Este comportamiento obedece a la formación de micelas [95] por parte del surfactante al estar en interacción con el medio nitrato-reductor, este cambio se puede apreciar en la figura 4.1 en la cual se muestra el gráfico del comportamiento que se observó al estar adicionando las concentraciones desde 0 hasta 10,000 ppm de GAELE. Se observó que al incrementar la concentración de surfactante por arriba de los 100 ppm se aprecia un cambio en el comportamiento de la tensión superficial, una vez que se llegó a la concentración de 1000 ppm no se observaron cambios significativos hasta los 10 000 ppm.

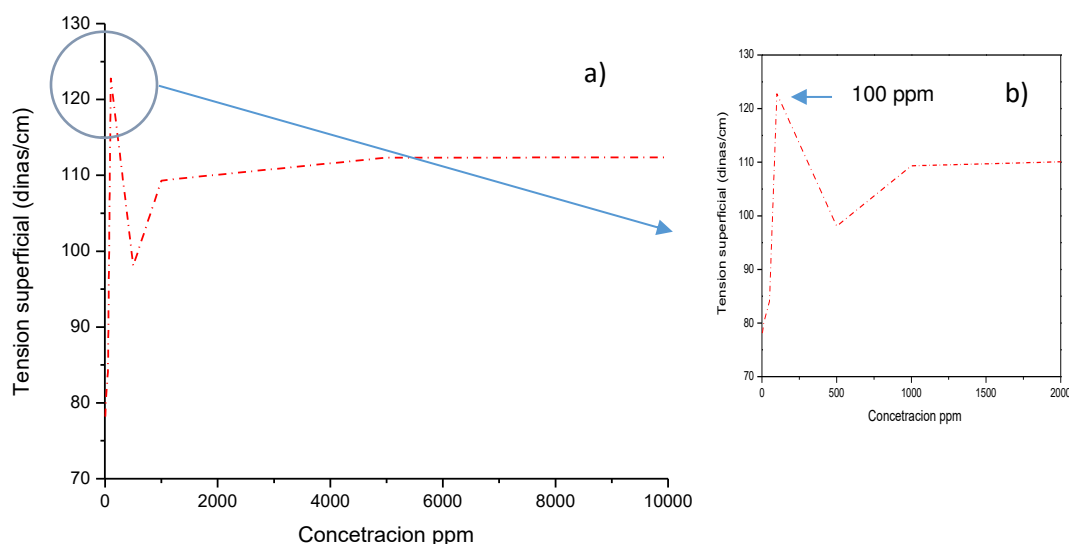


Figura 4.1 a) Comportamiento de la adición de 0 a 10,000 ppm de GAELE b) Comportamiento de la adición de 0 a 2000 ppm de GAELE

Una vez identificado lo anterior, se determinó que la concentración de surfactante a emplear en los experimentos es una concentración menor a la concentración micelar crítica. La concentración empleada para los experimentos en *batch* y RFA fue de 100 ppm de GAELE, de manera que a esta concentración en la que se da inicio a la formación de las micelas para promover la biodisponibilidad y dispersión del fluoreno, logrando con ello que las bacterias puedan detectar la presencia del fluoreno y con ello las enzimas bacterianas dieran comienzo la degradación.

4.2 Ensayos en reactores *batch*

4.2.1 Mediciones ORP, pH, OD y Temperatura

Los resultados relacionados con las mediciones de las pruebas *batch* se desarrollaron pasados los 60 días después de haberse puesto en marcha la biodegradación y se compararon con los resultados obtenidos al inicio de la biodegradación como se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Resultados de la medición de parámetros batch

Parámetro	Inicial	Final
pH	6.9 ±(0.2)	6.9 ± (0.2)
ORP (mV)	80 ± (1)	60 ± (1)
OD (mg.L ⁻¹)	6.5 ± (0.2)	3 ± (0.1)
Temperatura (°C)	32 ± (2)	33 ± (2)

Como se puede observar en la tabla 4.1, no se registró variación del pH lo que sugiere que a pesar de haber obtenido una biodegradación del 99 % la generación de los ácidos orgánicos no afectó el pH, debido a la concentración de las sales buffer presentes en medio nitrato-reductor. La generación de subproductos como son los ácidos orgánicos, son asociados a una disminución del pH [123]. En los medios acuosos la variación tanto de la temperatura y pH influye en la biodegradación de los HAPs [66]. Se ha demostrado que la biodegradación del fluoreno se ve afectada por los cambios en el pH, temperatura, salinidad y concentración de nitrógeno, siendo la temperatura optima 35°C [124], por lo cual los reactores *batch* permanecieron en una incubadora a 34-36 °C antes de que se evaluaran de los parámetros ambientales.

En la tabla 4.1 también se observó una disminución del ORP sin embargo, esta se mantuvo dentro de los rangos de una respiración anaerobia bajo condiciones sub anóxicas según lo reportado [85], lo que sugiere que se presentó una des-nitrificación por parte del consorcio y que el aceptor final de electrones es el nitrógeno. Sin embargo, la disminución del OD, sugiere que parte del oxígeno presente en los reactores pudo haber sido usado por el consorcio para la ruptura de los anillos bencénicos. Esta propuesta ha sido previamente reportada [82] en la que se sugiere que el nitrógeno y oxígeno pueden ser usados por los microorganismos como aceptores finales de electrones en la biodegradación de HAPs.

Considerando lo anterior, se puede confirmar la presencia de un consorcio facultativo durante los ensayos de biodegradación en este tipo de reactores, ya que se ha observado que existe una disminución tanto en el ORP como en el OD, la cual es asociada en la des-nitrificación.

Cabe señalar que estas determinaciones se realizaron a los reactores que tenían presencia de biomasa.

4.2.2 Asimilación de nitratos

La asimilación de nitratos se desarrolló una vez transcurridos los 60 días tanto para los reactores con presencia de biomasa como los controles de la pérdida abiótica, los resultados se presentan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Resultados de la reducción de nitratos para los reactores batch

Muestra	Resultado 48 horas de incubación
Control 1	Rosa
Muestra 1	Sin cambio de color
Muestra 2	Sin cambio de color

La muestra del control presenta la coloración rosa lo que sugiere que aún después de 60 días de reacción existe la presencia de nitratos, lo que sugiere que no existió contaminación de microorganismos o bien que estos no se adaptaron a las condiciones de des-nitrificación. Por otra parte, en las muestras 1 y 2 no se presenta cambio de color y esto se interpreta que efectivamente se llevó a cabo una nitrato-reducción. Lo cual fue confirmado con los resultados obtenidos del ORP Tabla 4.1. Los resultados de la prueba de asimilación de nitratos fueron interpretados con base a lo establecido en el procedimiento [113].

4.2.3 MCV en reactores batch

La determinación de la MCV en los reactores se desarrolló, con base en lo propuesto en el capítulo anterior apartado 3.5.4, obteniendo una concentración de 12 mg.L^{-1} de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) en el concentrado obtenido de la centrifugación de la biomasa. Para el desarrollo de las pruebas en *batch* fue necesario aplicar 3 mL de biomasa a cada vial, lo que equivaldría a una concentración aproximada de 36 mg en cada reactor de biomasa que fue agregada para la biodegradación del fluoreno.

4.2.4 Estudio de biodegradación en reactores batch

El estudio de biodegradación de fluoreno en reactores *batch* a una concentración de 200 mg.L^{-1} , se llevó a cabo empleando una concentración de biomasa de 36 mg en cada reactor. Las muestras fueron tomadas a los 20, 40, 60 y 80 días después del inicio de la reacción. Los resultados se muestran en la Figura 4.2 donde se puede apreciar que ocurre una reducción del 60% una vez transcurridos 20 días de reacción y una total biodegradación hasta los 60 días, la cual fue confirmada en la muestra tomada a los 80 días. Sin embargo, no se puede asegurar que se registre un 100 % de eliminación debido a que el límite de detección del equipo es $< 1 \text{ mg.L}^{-1}$, es por ello que confirmamos que se logra un 99% de remoción a los 60 días; en lo referente a la pérdida abiótica se observó que no rebasó el 5 % de pérdida transcurridos los 80 días, lo cual sugiere que la remoción de fluoreno fue llevada a cabo por la presencia del consorcio microbiano.

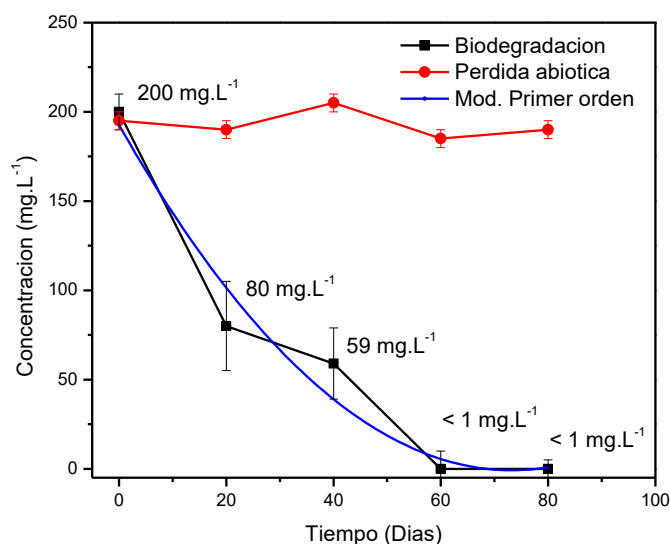


Figura 4.2 Patrón de biodegradación de fluoreno en reactores batch a una $C_0 = 200 \text{ mg.L}^{-1}$.

En estudios previos enfocados en la biodegradación de fluoreno, que han sido reportados bajo condiciones en *batch*, lograron un 90% de degradación partiendo de una concentración inicial 50 mg.L^{-1} de fluoreno con 5 mg.L^{-1} de biomasa bajo sulfato-reducción. Sin embargo, en este

reporte fue necesario emplear fenol para lograr la biodegradación, el cual se reporta que aparece como metabolito [125]. Por otra parte la biodegradación de fluoreno y fenantreno agregando 5 mg.L⁻¹ de concentración inicial cada uno combinados logrando hasta un 88% y 65% de biodegradación respectivamente bajo condiciones sulfato-reductoras con una concentración de biomasa de 10 mg.L⁻¹; sin embargo, existió la presencia de los metabolitos fenol y ácido acético derivados del fluoreno; ambos estudios se desarrollaron en un periodo de 21 días [126], los estudios relacionados con la biodegradación de HAPs bajo condiciones nitrato-reductoras son diversos [82], [127]–[129]. No obstante, estudios relacionados con la biodegradación de fluoreno en reactores *batch* bajo condiciones nitrato-reductoras es limitada.

Estudios más recientes proponen la aplicación de microorganismos obtenidos de sedimentos de río, logrando un rango de biodegradación 97.9 a 99.9 % de fluoreno a los 14 días de incubación; no obstante, la aplicación de microorganismos aislados en este tipo de estudios, presenta la limitación de que se pueden inhibir por la formación de subproductos como sugieren los autores [130]. La biodegradación también es afectada por el peso molecular de los HAPs siendo eliminados los de menor peso molecular primero [76], cabe señalar que las condiciones de desarrollo de la biodegradación también son de importancia como son la temperatura, pH entre otras como ya se ha mencionado.

Las limitaciones en la biodegradación también pueden ser generadas por la falta de nutrientes o cambios en las concentraciones de los sustratos [131]. Se ha reportado que el cambio de las sales de nitrato y nitrito afecta la respiración de los microorganismos [110] aunado al efecto que ejercen sobre estos la toxicidad de los HAPs [76], [132]. Debido a lo mencionado anteriormente, la biodegradación del fluoreno puede ser afectada por diversos factores como la utilización de un consorcio autóctono el cual no había estado en presencia de este HAP, por lo que su tiempo de adaptación a esta fuente de carbón incrementa el tiempo de biodegradación, aunado a la toxicidad del fluoreno que pudo haber afectado a algunas especies del consorcio, otro factor que no es menos importante que puede influenciar la biodegradación son las concentraciones de las sales de nitrato y nitrito como ya se ha mencionado anteriormente afectan la biodegradación de los HAPs. Lo antes descrito pudo haber influenciado la completa biodegradación del fluoreno a 60 días utilizando una concentración inicial de 200 mg.L⁻¹, debido a los resultados obtenidos se decidió continuar trabajando utilizando un reactor de flujo

ascendente, el cuál además de reducir los tiempos de degradación, facilitan las condiciones de operación *in-situ*.

4.2.5 Constate de biodegradación batch

La determinación de la constante de biodegradación de fluoreno se desarrolló con base en las mediciones de la biodegradación de 200 mg.L⁻¹ transcurridos los 60 días para los tres ensayos, las constantes cinéticas se obtuvieron a partir del modelo de primer orden desarrollado en el programa (Sigmaplot®, Systat Software, Inc.).

Los parámetros de medición para los tres ensayos y las constantes obtenidas se mencionan en la tabla 4.3 y el comportamiento de biodegradación con el modelo cinético se ilustra en la Figura 4.2.

Tabla 4.3 Resultados de biodegradación de 200 mg.L⁻¹ fluoreno ensayos batch

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (días)	60	60	60
OD (mg.L ⁻¹)			
Inicial	6.2	6.0	6.1
Final	2.8	3.1	3.0
ORP (mV)			
Inicial	80.1	80	82
Final	59	61	58
pH Inicial, Final	6.9, 6.9	6.89, 6.9	6.9, 6.9
Perdida abiótica %	2.4	2.1	2.5
Biodegradación %	96	98	97
Constante (k)			
Mod. Primer orden (d ⁻¹)	0.0409	0.0418	0.0414
(R ²) coeficiente de correlación	0.9889	0.9932	0.9946

Tabla 4.44 Comparativo de constantes de biodegradación y sus condiciones.

	Este trabajo	C. H. Li y col.[133] *	M. Shahriari Moghadam y col [124]**
HAP	Fluoreno	Fluoreno	Fluoreno
Concentración mg.L ⁻¹	200	5000	500
Medio de cultivo	Nitrato-reductor	Combinación SO ₄ ²⁻ y NO ₃ ⁻	Medio mineral**
Microorganismos	Consortio	Consortio*	Consortio**
Reactor	<i>Batch</i>	<i>Batch</i>	<i>Batch</i>
Tiempo (días)	60	41-55	20
Perdida abiótica %	2.5	4-15	5
Biodegradación %	99	99	92.18
Constante (k)	0.0409	0.0127	0.122
(R ²) coeficiente de correlación	0.9889	0.9405	-----
* Sedimentos de manglar			
** Medio mineral con cambios en las concentración de nitrato, sedimento de manglar			

La constante cinética obtenida ha sido comparada con reportes previos Tabla 4.4. Las constantes reportadas de ambos estudios fueron determinadas por el modelo de primer orden. Se puede observar que la constante obtenida en nuestro estudio es mayor que la obtenida por los otros reportes, esto se puede atribuir a la correlación de los datos y a las condiciones de desarrollo de los otros experimentos, uno de los factores que podrían influir en esto son las especies de microorganismos contenidas en los sedimentos de los manglares; a su vez de que en el primer estudio se llevó a cabo en combinación con otros HAPs, lo que también puede retrasar la biodegradación ya que se ha establecido que la biodegradación da inicio con el menor peso molecular y a esto hay que sumar la toxicidad de los HAPs. El autor establece que la biodegradación anaerobia es más lenta que la aerobia [133], cabe señalar que se determinaron constantes para cada HAP.

Por otra parte el segundo estudio se desarrolló en condiciones muy semejantes al primero, con una concentración 10 veces menor al anterior, en presencia de fenantreno. Las constantes determinadas en este estudio se determinaron para cada HAP, las especies presentes en los sedimentos del manglar pueden haber sido las que influenciaron la biodegradación del fluoreno en 20 días. Sin embargo, en este contexto no se puede generalizar ya que si bien reportan altas

tasas de biodegradación por parte de los consorcios. Las condiciones de desarrollo de dichos ensayos son diversas, sin embargo proporcionan información relevante para suponer los tiempos de eliminación del fluoreno bajo estas condiciones considerando que los consorcios pueden ser afectados por la carga orgánica, pH, Temperatura, Toxicidad del HAP, entre otras.

4.3 Ensayos en RFA

4.3.1 Mediciones ORP, pH, OD y Temperatura

Las mediciones relacionadas con el ORP, pH, OD y Temperatura se desarrollaron para todas las concentraciones de fluoreno 100, 150, 200, 250, 300, 350 mg.L⁻¹ tanto iniciales como finales, para ello se tomaron muestras de influente y efluente en el reactor de flujo ascendente, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.5.

Tabla 4.5 Parámetros de medición RFA

Concentración mg.L ⁻¹	100		150		200		250		300		350	
Parámetro	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
OD ppm	6.7	4.21	6.85	4.19	6.82	4.89	6.23	4.84	6.42	3.96	5.96	4.18
ORP (mV)	70	-129	71.4	-120	76	-130	75.8	-70.2	80.6	-115	85	-106
pH	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9
Temp. (°C)	30	29	31	30	29	31	29	30	31	30	31	30

La nula variación del pH de se puede relacionar a lo mencionado anteriormente en el estudio en los reactores *batch*, sugiere que a pesar de haber obtenido biodegradaciones por encima del 88 % para todas las concentraciones la generación de los ácidos orgánicos no afectó el pH debido a la concentración de las sales buffer presentes en medio nitrato-reductor, a su vez la reducción de los parámetros de OD y ORP se relaciona al mecanismo de respiración de los

microorganismos del consorcio ya que parte de estos establecen al Oxígeno como aceptor final de electrones en la asimilación del fluoreno.

Por otra parte la reducción del ORP se relaciona en la reducción significativa del ion nitrato y a que está ocurriendo una nitrato-reducción por parte del consorcio, se ha reportado que la reducción del ORP de 80 mV hasta -260 mV en un reactor de biopelícula anaerobio bajo condiciones nitrato-reductoras [134], es porque establece como aceptor final de electrones al ion nitrato, se ha demostrado que la biodegradación puede ser afectada por la cantidad de oxígeno presente en conjunto con la nitrato-reducción [82], en la biodegradación de HAPs, por lo que la reducción de ambos parámetros OD y ORP y asimilación del fluoreno nos indican que el reactor desarrolló la biodegradación de todas las concentraciones del fluoreno en este estudio.

4.3.2 Asimilación de nitratos RFA

La presencia de nitratos es asimilada por parte del consorcio lo que sugiere que gran parte de la respiración de los microorganismos han establecido como al aceptor final de electrones al nitrógeno y esto es comprobado a las 48 horas de incubación ya que no se observa cambio en las muestras del puerto 1, 6 y 7 en el tiempo cero y una vez transcurridas las 48 horas de incubación, ya que solo se puede observar la coloración característica rojo (prontosil) en la muestra del influente Tabla 4.6, lo que sugiere que la biomasa presente en el reactor asimila los nitratos presentes en el medio, esta prueba confirma la reducción del ORP mencionado anteriormente.

Tabla 4.6 Resultados de la prueba de reducción de nitratos para el reactor de flujo ascendente

Muestra	Muestra al tiempo 0	48 horas de incubación
Influente	Rosa	Rosa
Puerto 1	Sin cambio de color	Sin cambio de color
Puerto 6	Sin cambio de color	Sin cambio de color
Puerto 7 (efluente)	Sin cambio de color	Sin cambio de color

4.3.3 Resultados de DQO y DBO₅ RFA

Los resultados que se obtuvieron de la determinación de DQO y DBO₅ se muestran en la Tabla 4.7 las concentraciones que se suministraron al reactor fueron 100, 200, y 350 mg.L⁻¹ y un blanco que consistió en el medio nitrato-reductor y 100 µL de GAELE. Los resultados de la DQO muestran que la carga orgánica muestra un ascenso conforme se aumenta la concentración de fluoreno, por otra parte las reducciones de la DQO varía en cada muestra, observándose una menor disminución en el medio nitrato-reductor en presencia del GAELE y una mayor remoción en las concentraciones del 300 y 350 mg.L⁻¹, esto se puede relacionar con el hecho de que carga orgánica químicamente oxidable es mayor derivado del incremento de la concentración del fluoreno.

Tabla 4.7 Resultados DQO Y DBO₅ en la nitrato-reducción de fluoreno reactor de flujo ascendente

	Influente medio nitrato- reductor	Efluente medio nitrato- reductor	Influente medio nitrato- reductor + 100 (mg.L ⁻¹) fluoreno	Efluente medio nitrato- reductor + 100 (mg.L ⁻¹) fluoreno	Influente medio nitrato- reductor + 200 (mg.L ⁻¹) fluoreno	Efluente medio nitrato- reductor + 200 (mg.L ⁻¹) fluoreno	Influente medio nitrato- reductor + 350 (mg.L ⁻¹) fluoreno	Efluente medio nitrato- reductor + 350 (mg.L ⁻¹) fluoreno
DQO (mg.L ⁻¹)	7295	4865	8200	4690	10400	3955	10840	4395
DBO ₅ (mg.L ⁻¹)	4049	3024	2912	2520	5576	3178	6187	3793
Concentración de GAELE 100 µL								

Sin embargo la evaluación de la DBO₅ reporta un aumento en la carga orgánica, pero del total de esta, la bioquímicamente oxidable es menor con respecto a la DQO esto se asocia a la solubilidad y toxicidad del fluoreno, ya que las muestras del efluente son las que estuvieron en contacto con la biopelícula, por lo que se puede deducir que el fluoreno es biodegradado por el consorcio presenten en la biopelícula, por otra parte las fluctuaciones que se observan la muestra del medio nitrato reductor y la de 100 mg.L⁻¹ se puede asociar a un error en la adición del dispersante GAELE, ya que se ha reportado que este aporta carga orgánica al medio [37]

Tabla 4.8 Porcentajes de remoción de DQO Y DBO₅ en la nitrato-reducción de fluoreno reactor de flujo ascendente

	Medio nitrato-reductor	Medio nitrato-reductor + 100 (mg.L ⁻¹) fluoreno	Medio nitrato-reductor + 200 (mg.L ⁻¹) fluoreno	Medio nitrato-reductor + 350 (mg.L ⁻¹) fluoreno
% DQO (mg.L ⁻¹)	33.3	42.8	62.0	59.5
% DBO ₅ (mg.L ⁻¹)	25.3	13.5	43.0	38.7
Concentración de GAELE 100 µL				

La concentración que reporta una mayor remoción tanto de DQO como de DBO₅ es la de 200 mg.L⁻¹ logrando hasta un 62 y 43 % de remoción respectivamente, los porcentajes de remoción se observan en la tabla 4.8, siendo la concentración de 350 mg.L⁻¹ y 200 mg.L⁻¹ en las se observa muy poca variación en los porcentajes de remoción por lo que se puede deducir que la concentración de saturación del fluoreno es de 200 mg.L⁻¹ y no se presentaría un incremento muy notorio si se sigue incrementando la concentración del fluoreno; cabe señalar que se nota una ligera disminución de los porcentajes de remoción a 350 mg.L⁻¹ esto se puede atribuir a la toxicidad del fluoreno a altas concentraciones.

4.3.4 Resultados de MCV en el reactor RFA

La determinación de la MCV se desarrolló por segmento y el resultado de la sumatoria de todos los segmentos alcanzo una concentración final de biomasa de 11.68 g presente en el RFA como se establece en la Tabla 4.9; para determinar el área superficial se considera una forma esférica del lecho empacado, una vez obtenido este dato se determinó el grosor de la biopelícula que como se puede observar pese a que el área superficial del segmento uno es menor es donde se registra un mayor grosor de la biopelícula, por lo que se registra una mayor biodegradación en los primeros segmentos derivados de la alta concentración de biomasa presente en estos segmentos. También se observa que a medida sé que incrementa la altura del reactor el grosor de la biopelícula se fue reduciendo en el reactor.

Tabla 4.9 Concentración de biomasa, área superficial y grosor de biopelícula por segmento RFA

# Segmento	Concentración de biomasa (g)	Área superficial del segmento (cm ²)	Grosor de biopelícula (μm)
6	1.3	573.3	208.1
5	2.9	1521.2	225.3
4	2.2	955.0	239.0
3	1.6	785.9	212.0
2	2.9	528.2	281.6
1	0.8	379.7	296.4

Tanto la biopelícula como el espesor de esta pueden ser influenciados por diversos factores, principalmente por las velocidades del flujo a la que se exponen los microorganismos del reactor. Se ha observado que la velocidad del flujo influye en el espesor de la biopelícula [98], a una velocidad de flujo mayor la biopelícula tiende a ser más delgada provocado por desprendimientos de las partes más vulnerables. En el reactor se observa que el espesor de la biopelícula es mayor en los tres primeros puertos, ya que el flujo fue ascendente la pérdida de biomasa relacionada con la variación de flujo en los primeros puertos pudo haberse incrustado a lo largo del reactor promoviendo homogeneidad en las especies dentro del reactor y un crecimiento homogéneo, el cual se puede apreciar en la Tabla 4.9.

Por otra parte, la estructura de la biopelícula es una red compleja que depende de un rango amplio de variables como son el sustrato, nutrientes, fenómenos de difusión e inhibidores de la biopelícula entre otras por lo que la comprensión de la estructura de la biopelícula, su cinética de biodegradación y el impacto de la estructura de la biopelícula sobre la cinética de degradación [135], se debe de desarrollar en otro estudio ampliamente.

4.3.5 Estudio de biodegradación en RFA

Para el estudio de la biodegradación de fluoreno en un reactor de flujo ascendente se emplearon las concentraciones de 100, 150, 200, 250, 300, 350 mg.L⁻¹ con dos TRH 0.75 y 1.25 h, los resultados se muestran en la Tabla 4.10 y se ilustran en la Figura 4.3, donde se puede observar que se requiere una menor altura del reactor para obtener una mayor biodegradación del fluoreno a un TRH 1.25 h, esto se debe a que se tiene una mayor cantidad de biomasa en los tres primeros puertos del reactor, comparado con los resultados obtenidos a un TRH 0.75 h, estos resultados fueron los esperados ya que al existir un flujo de contaminante más lento la interacción entre el consorcio y el contaminante se ve incrementada favoreciendo así la degradación a menor altura.

Tabla 4.10 Resultados de biodegradación del fluoreno RFA

Concentración mg-L ⁻¹	% de biodegradación	
	TRH=0.75 h	TRH= 1.25 h
100	90	88.7
150	92.0	88.6
200	91.7	94.2
250	95.3	95.2
300	95.2	95.3
350	92.2	95.7

Al incrementar el TRH a 1.25 h se puede observar que el reactor puede soportar una mayor cantidad del fluoreno sin embargo se tiene el antecedente que al incrementar la concentración del contaminante también lo hace su toxicidad [85]. Es por ello que, para evitar el decaimiento del consorcio, no se alimentó con una mayor concentración de fluoreno, otro factor importante que puede afectar el comportamiento de biodegradación en los reactores de biopelícula es la variación en las concentraciones de los nutrientes, ya que se ha reportado que afectan a las especies presentes en el consorcio [136] se ha demostrado que los cambios de las concentraciones de los iones nitrato y nitrito puede afectar la biodegradación de HAPs[110], Es por ello que para este estudio se mantiene constante la concentración de las sales del medio de cultivo y a su vez se emplearon dos tiempos de retención para su desarrollo.

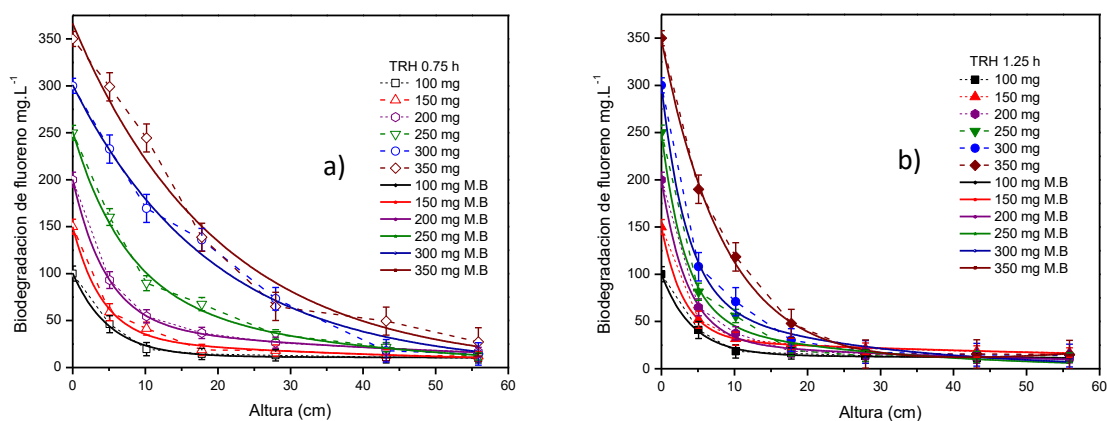


Figura 4.3 Patrón de biodegradación de fluoreno utilizando el modelo bifásico a) TRH 0.75 h b) TRH 1.25 h

Por otra parte los porcentajes de biodegradación del fluoreno se mantienen con muy poca diferencia entre ambos TRH, como se aprecia en la Tabla 4.10 por lo que se puede deducir que ambos TRH ofrecen hasta un 95 % de biodegradación del fluoreno, esto se traduce hablando en un contexto de aplicación que a estas concentraciones no existen diferencias significativas a la hora de determinar cuál de ambos tiempos a emplear, sin embargo si se escogiera un TRH corto para estas concentraciones los gastos energéticos asociados a la biodegradación se disminuyen, por otro parte la determinación de las constantes cinéticas ofrece una amplia información sobre el comportamiento del reactor y los efectos del fluoreno en las constantes cinéticas sugiriendo que la capacidad de biodegradación se incrementa con el cambio del TRH.

4.3.6 Constantes de biodegradación RFA

Una vez obtenidos los patrones de biodegradación se procedió a obtener los parámetros cinéticos con el modelo bifásico o de decaimiento de doble fase como se describe en la sección 3.5.8. Una vez establecidas las constantes de máxima utilización con el modelo de Arvin se determinaron las curvas hiperbólicas de saturación del modelo de Monod.

El modelo bifásico tiene la limitación de no considerar los valores relacionados con la cantidad de biomasa presente en el reactor, sin embargo, proporciona valores predictivos del

comportamiento de biodegradación en los dos TRH evaluados en este trabajo, las constantes cinéticas obtenidas con el modelo bifásico para ambos TRH y las constantes obtenidas con el modelo de Arvin K_{max} se relaciona con las constantes de máxima utilización y las $K_{vel.}$ iniciales se relaciona con las constantes de las velocidades iniciales obtenidas del comportamiento de la curva de cada concentración todas las constantes obtenidas se mencionan en la Tabla 4.11.

Las constantes determinadas por el modelo bifásico para ambos tiempos de retención establecen que cuando se alimenta al reactor con un TRH de 0.75 h se observa que las constantes cinéticas disminuyen a partir de la concentración de 250 mg.L⁻¹ siendo las concentraciones de 300 y 350 mg.L⁻¹ en las que ya no se tiene un comportamiento del modelo bifásico, este comportamiento se puede relacionar al hecho de que la cantidad de fluoreno que se está alimentando al reactor está en los límites de tolerancia del consorcio.

Tabla 4.11 Constantes cinéticas de los modelos de doble fase y Arvin.

Parámetros	100 mg.L ⁻¹	150 mg.L ⁻¹	200 mg.L ⁻¹	250 mg.L ⁻¹	300 mg.L ⁻¹	350 mg.L ⁻¹
Biodegradación 0.75 h %	90	92	91.7	95.3	95.2	92.2
Biodegradación 1.25 h %	88.7	88.6	94.2	95.2	95.3	95.3
MDDF 0.75 h (k) (h ⁻¹)(R ²)	0.1974 (0.9968)	0.2261 (0.9950)	0.1964 (0.9999)	0.1067 (0.9951)	0.0515 (0.9922)	0.0500 (0.9809)
MDDF 1.25 h (k) (h ⁻¹)(R ²)	0.2358 (0.9976)	0.3122 (0.9998)	0.2626 (0.9988)	0.2660 (0.9942)	0.2474 (0.9962)	0.1507 (0.9987)
Kmax Arvin (R ²) 0.75 h	0.7426 (0.9613)	0.9765 (0.9628)	0.9013 (0.9863)	1.0007 (0.7127)	1.1431 (0.5000)	0.7892 (0.7550)
Kmax Arvin (R ²) 0.1.25 h	0.8758 (0.7431)	0.8434 (0.7572)	1.4342 (0.9751)	1.9201 (0.7445)	1.6850 (0.8219)	1.9859 (0.4279)
K _{vel} iniciales Arvin (R ²) 0.75 h	1.7683 (0.9670)	1.8507 (0.9630)	1.2931 (0.9922)	0.8008 (0.9790)	0.3564 (0.9856)	0.3796 (0.9058)
K _{vel} iniciales Arvin (R ²) 1.25 h	1.0069 (0.8782)	0.9060 (0.8756)	1.5970 (0.9878)	1.7813 (0.9221)	1.3996 (0.9585)	0.9590 (0.9252)
MDDF Modelo de Decaimiento de Doble Fase						

Sin embargo, se sigue registrando una alta tasa de biodegradación a estas mismas concentraciones, ya que si bien puede considerarse que se encuentra saturado el reactor no ha superado los límites de carga orgánica que puede soportar y esto puede ser comprobado con las constantes cinéticas del modelo de Arvin obtenidas a partir de las velocidades iniciales, ya que se presenta el mismo fenómeno de decaimiento de las constantes a partir de la concentración de 250 mg.L⁻¹.

Por otra parte, cuando se amplía el TRH a 1.25 h se observa que las constantes cinéticas para el modelo bifásico disminuyen a partir de la concentración de 300 mg.L⁻¹, pero las constantes no decaen al grado del TRH de 0.75 h además de seguir el comportamiento del modelo bifásico. En la Figura 4.4 se muestra el comportamiento de las constantes obtenidas con el modelo bifásico, donde se observa de forma gráfica lo antes descrito en el comportamiento de las constantes cinéticas.

Las constantes obtenidas con el modelo cinético de Arvin tanto las K_{max} como las $K_{vel.}$ iniciales son mayores en comparación con las obtenidas por el modelo bifásico para ambos TRH. Esto se debe a que el modelo de Arvin considera la presencia de la biomasa y el caudal para la determinación de ambas constantes, sin embargo, ya que el comportamiento de las curvas para ambos TRH no tienden a la linealidad se tuvo que determinar las constantes de velocidades iniciales a partir de las curvas que se muestran en la figura 4.5 de la relación obtenida del influente efluente de cada concentración vs la masa celular acumulativa obtenida de los segmentos del reactor. En la tabla 4.11 se muestran las constantes obtenidas con el modelo de Arvin donde se puede observar que el coeficiente de correlación disminuye a medida que la concentración se incrementa en las constantes K_{max} , por lo que las constantes obtenidas a partir de las velocidades iniciales $K_{vel.iniciales}$ ofrecen una mejor correlación para la determinación de la curva hiperbólica de Monod.

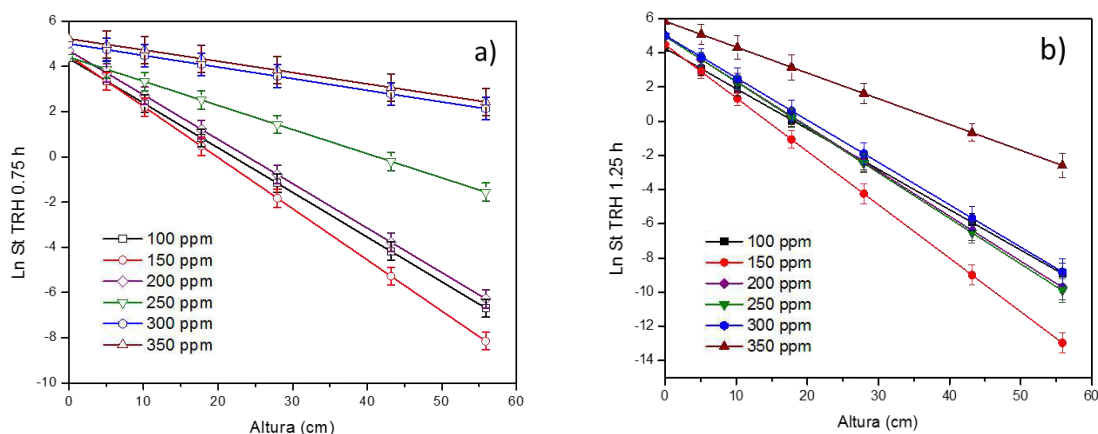


Figura 4.4 Comportamiento de las constantes de biodegradación modelo bifásico a) TRH 0.75 h
b) TRH 1.25 h

Las curvas obtenidas de la relación de Si/Se dónde Si es la concentración inicial y Se es la concentración de medición en cada puerto, proporcionan el comportamiento de las curvas en la biodegradación las cuales sirven de base para la determinación de las constantes de velocidades iniciales, las curvas relacionadas al TRH de 0.75 h se puede apreciar la saturación del reactor a partir de la concentración de 250 mg.L⁻¹, siendo la concentración de 350 mg.L⁻¹ en la que ya se presenta la saturación, esto se puede atribuir a que el tiempo de residencia de cada concentración de fluoreno influye en el comportamiento de las curvas. Por otra parte, cuando el TRH es de 1.25 h se puede observar una tendencia de inhibición acumulativa a partir de la concentración de 250 mg.L⁻¹ esto puede atribuirse a la dispersión del fluoreno y su toxicidad ambos pueden influir en el comportamiento de las curvas, Figura 4.5.

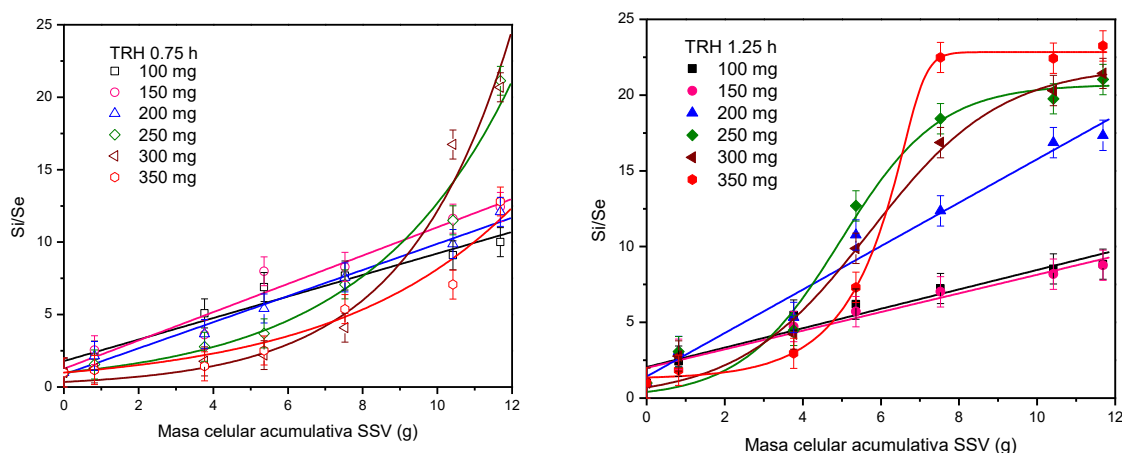


Figura 4.5 Tasas máximas de utilización a) TRH 0.75 h b) TRH 1.25 h

Una vez determinadas las constantes cinéticas con el modelo de Arvin, tanto las de velocidades iniciales y las de máxima utilización, se determinó la tasa de máxima de saturación con el modelo de Monod; a su vez las constantes de saturación media de para ambos TRH Tabla 4.12, siendo las constantes de 0.75 h mucho menores con respecto a las obtenidas a un TRH de 1.25 h, sin embargo, el modelo de Monod sugiere que la constante media de saturación para este tiempo de retención es de 687.03 mg.L⁻¹ como se esperaba ya que se utiliza un flujo más lento

al incrementar el TRH. Como ya se ha mencionado anteriormente los factores como difusión del contaminante y la concentración son parámetros que influyen en la biodegradación y comportamiento de la biopelícula, es por ello que se debe de considerar la toxicidad del fluoreno y su baja solubilidad para considerar concentraciones por arriba de los 350 mg.L⁻¹ además de la cantidad de surfactante para que disperse homogéneamente el fluoreno en el medio nitrato-reductor, ya que se observó que se tenía que mantener a una velocidad de agitación mayor para

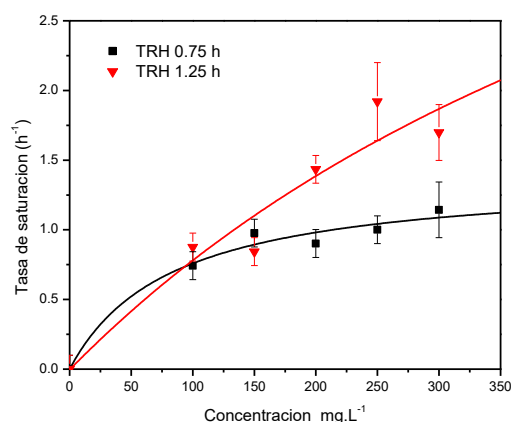


Figura 4.6 Curvas de saturación hiperbólicas de Monod TRH 0.75 y 1.25 h

seguir manteniendo una dispersión homogénea en la concentración de 350 mg.L⁻¹ y considerar las afectaciones que provocaría lo antes mencionada en la biopelícula.

Tabla 4.12 Constantes cinéticas de saturación del Modelo de Monod

TRH (h ⁻¹)	Tasa máxima de saturación (μ _{max})(h ⁻¹)	Constantes de saturación media k _s (mg.L ⁻¹)
0.75	1.39	83.07
1.25	6.14	687.03

El comportamiento de la curva hiperbólica de Monod, se observa en la figura 4.6 donde se puede apreciar que a pesar de ser el mismo reactor y bajo las mismas condiciones experimentales el comportamiento de las curvas es distinto entre ambos TRH ya que si empleamos un TRH de 0.75 h la saturación media se presenta a los 83.07 mg.L⁻¹ pero cuando se amplía el TRH a 1.25 h o un flujo más lento la constantes de saturación media de Monod es de 687.03 mg.L⁻¹ seis veces mayor, por lo que se puede concluir que el TRH es un factor de gran importancia en la eliminación de HAPs y la determinación de las constantes ayuda en la predicción de las cantidades del contaminante que puede soportar los reactores de biopelícula,

ya que si bien el fluoreno pertenece a los de bajo peso molecular ofrece las bases para el estudio en la biodegradación de los de alto peso molecular bajo estas condiciones.

El comportamiento de biodegradación del RFA fue influenciado por la concentración del fluoreno que se alimentó al reactor, la presencia de biomasa y el área superficial en cada segmento para conocer qué influencia tienen estos parámetros en las curvas de biodegradación, se desarrolló la determinación del coeficiente de actividad bacteriana media para cada concentración Figura 4.7, para ello fue necesario determinar el coeficiente de actividad bacteriana media el cual se define como el coeficiente de variación de velocidad media de contacto de sustrato entre el área superficial y biopelícula del reactor.

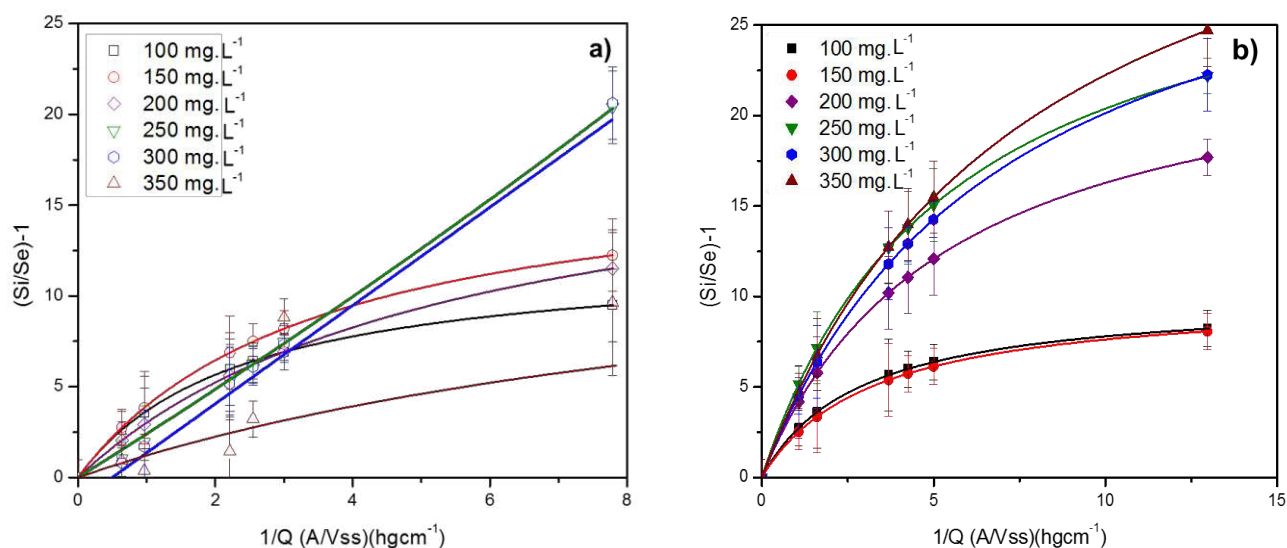


Figura 4.7 Gráficos del comportamiento del coeficiente de actividad bacteriana media a) TRH 0.75 h b) TRH 1.25 h

El comportamiento de las curvas obedece a la hipérbola que se genera al evaluar las constantes de Monod, sin embargo, la determinación que se desarrolla en estas curvas es relacionada a la obtención de dos parámetros el primero relacionado con la estimación de un coeficiente cinético de la actividad bacteriana media, el cual nos predice la concentración en la cual se tiene un comportamiento hiperbólico de las curvas, el otro parámetro es relacionado con la tasa máxima de conversión del sustrato, este se relaciona con la cantidad máxima de conversión del reactor

en relación con el área y cantidad de biomasa presente dentro de este en la tabla 4.13 se muestran los datos obtenidos para ambos parámetros.

Tabla 4.13 Coeficientes de conversión cinética de la actividad bacteriana

Concentración mg.L ⁻¹	TRH 0.75 h		TRH 1.25 h	
	Coeficiente cinético de actividad bacteriana media (h.g.cm ⁻¹)	Tasa máxima de conversión del sustrato	Coeficiente cinético de actividad bacteriana media (h.g.cm ⁻¹)	Tasa máxima de conversión del sustrato
100	2.37	12.38	2.86	10.02
150	3.49	17.74	3.21	10.07
200	5.51	19.66	5.35	24.99
250	2.71	19.89	5.47	31.55
300	2.77	19.91	7.04	34.32
350	11.61	15.32	7.75	39.49

Para ambos TRH se desarrolló la determinación del coeficiente de actividad bacteriana media obteniendo los siguientes resultados: en el TRH de 0.75 h, las concentraciones de 250 y 300 mg.L⁻¹ se observa un comportamiento lineal el cual es atribuido a que a estas concentraciones y el flujo que se está alimentando al reactor es muy rápido para ejercer un cambio significativo en la concentración durante los primeros puertos, por lo que se presenta la misma concentración del fluoreno a lo largo del reactor, esto se puede apreciar a partir de la concentración de 200 mg.L⁻¹ ya que la tasa máxima de conversión del sustrato se mantiene muy semejante para estas tres concentraciones; por otra parte el coeficiente cinético de la actividad bacteria decae también por lo que la conversión del fluoreno es más lenta dentro del reactor pero se logran porcentajes de remoción por encima del 90 % lo que sugiere que el reactor se está saturando y esto se confirma con los resultados obtenidos en la concentración de 350 mg.L⁻¹, ya que se observa un incremento en el coeficiente cinético de la actividad bacteriana cuatro veces mayor al obtenido en las concentraciones de 250 y 300 mg.L⁻¹, sin embargo el valor de la tasa máxima de conversión disminuye esto es atribuido a factores como la dispersión y fenómenos de difusión entre el sustrato y la superficie de la biopelícula, ya que si bien logra también porcentajes por encima del 90 % de remoción del fluoreno este es removido por toda la biomasa presente dentro de este de manera homogénea y no fraccionada por la influencia de la biopelícula presente en los primeros puertos del reactor.

Por otra parte para el TRH de 1.25 h se obtiene un comportamiento hiperbólico para todas las concentraciones Figura 4.7, las determinaciones tanto del coeficiente cinético de actividad bacteriana y la tasa máxima de conversión del sustrato se mantienen de forma creciente a lo largo de las concentraciones esto sugiere que este tiempo de retención es el óptimo para que el contacto entre el sustrato y la biomasa presente a lo largo del reactor provoquen porcentajes de remoción por encima del 90 % y en algunas concentraciones de hasta el 95 % de fluoreno, nótese que el coeficiente cinético inicia en 2.86 h.g.cm^{-1} en la concentración de 100 mg.L^{-1} y finaliza en 7.75 h.g.cm^{-1} en la concentración final por lo se puede deducir que el reactor puede soportar concentraciones mayores a 350 mg.L^{-1} de fluoreno a este tiempo de retención lo cual es confirmado por la tasa máxima que reporta la concentración de 350 mg.L^{-1} ya que es la mayor alcanzada, por lo que a esta concentración se observa que la conversión es rápida a lo sin comprometer la biomasa presente.

Por lo que se puede concluir que si se requiere una rápida eliminación de concentraciones menores a 350 mg.L^{-1} de fluoreno en condiciones nitrato-reductoras el TRH de 0.75 h puede lograrlo sin ningún estrago en la biomasa presente en el reactor, por otra parte si se quiere eliminar concentraciones mayores a 350 mg.L^{-1} pero sin rebasar lo establecido por la constantes de saturación media de 687.03 mg.L^{-1} determinada por el modelo de Monod, se puede aplicar un TRH de 1.25 h sin comprometer la biomasa presente en el reactor.

Capítulo 5 Conclusiones y recomendaciones

La biodegradación del fluoreno se logró bajo condiciones nitrato-reductoras empleado un consorcio microbiano que ya había sido empleado en estudios de biodegradación de diésel, las pruebas desarrolladas en los reactores *batch* establecen constantes de biodegradación obtenidas con el modelo de primer orden una cuarta parte más lentas que las obtenidas en las pruebas en el reactor de flujo ascendente, además de ser necesario un periodo de reacción de 60 días para obtener un 99 % de biodegradación al emplear 200 mg.L^{-1} de concentración inicial de fluoreno.

La prueba de asimilación de nitratos tanto para la biomasa que se utilizó en las pruebas *batch* como la que se desarrolló dentro del reactor de flujo ascendente, sugiere que ambos consorcios son facultativos, ya que parte de estos establecen al ion nitrato como aceptor final de electrones, logrando con ello una nitrato-reducción, por lo que se puede concluir que ocurren dos procesos con potencial aplicación medio ambiental en paralelo; por una parte la biodegradación del fluoreno como hidrocarburo aromático policíclico y por otra la reducción de la concentración de nitratos en los efluentes el cual es un problema común en nuestro país por consecuencia del uso de fertilizantes y sistemas sépticos.

La biodegradación de fluoreno en el RFA, a diferentes concentraciones, establece que al cambiar el TRH de 0.75 a 1.25 h el patrón de biodegradación también sufre una modificación, esto se relaciona en parte a la alta concentración de biomasa presente en el reactor, ya que con el TRH de 1.25 h se obtiene una eliminación de hasta un 80 % del fluoreno en los tres primeros puertos, sin embargo, la tasa de biodegradación final permanece muy parecida para ambos TRH logrando hasta un 95.7 % de biodegradación.

Por otra parte, las constantes cinéticas obtenidas para el RFA por los modelos bifásico y de Arvin establecen que con un TRH de 0.75 h el reactor presenta saturación a una concentración de 250 mg.L^{-1} ya que las constantes decrecen a tal punto que se considera que no obedece al modelo bifásico en las concentraciones de 300 y 350 mg.L^{-1} , no obstante no se presenta tal fenómeno con el TRH de 1.25 h las constantes decrecen pero sigue obedeciendo el modelo bifásico aún para la máxima concentración estudiada. Al determinar las constantes de biodegradación con el modelo de Arvin, se establece una relación muy semejante a las constantes obtenidas con el modelo bifásico solo que este modelo si considera la cantidad de

biomasa presente en el reactor por lo que se puede asegurar que la cantidad de biomasa influye en la biodegradación del fluoreno con un TRH de 1.25 h ya que se observa que el incremento de las constantes no sufren cambios aparentes pero siguen el crecimiento hasta la concentración de 300 mg.L⁻¹, siendo la concentración de 350 mg.L⁻¹ en donde se compromete la solubilidad de la dispersión homogénea del fluoreno dentro del medio nitrato-reductor, además de que también se puede considerar a partir de esta concentración se está llegando a los límites de tolerancia hacia la toxicidad del fluoreno por parte del consorcio.

El comportamiento de las curvas hiperbólicas del modelo de Monod sugiere que se alcanza la saturación del reactor a una concentración de 83 mg.L⁻¹, para un TRH de 0.75 h por lo que concuerda con lo antes dicho en el comportamiento de las constantes obtenidas por los modelos bifásico y Arvin, y un cambio sustancial al cambiar el TRH a 1.25 h implementando las mismas concentraciones de fluoreno sugiriendo que la saturación de reactor se puede alcanzar a una concentración de 687 mg.L⁻¹ pero se tienen que considerar lo antes descrito como la toxicidad y la adición de más surfactante para promover la dispersión, por lo que puede resultar en afectaciones muy significativas al consorcio.

La determinación del coeficiente cinético de actividad bacteriana media y la tasa máxima de conversión del sustrato proporcionan información muy relevante en relación al comportamiento que se tiene dentro del reactor además de ser uno de los primeros trabajos en los que se presenta tal determinación, la cual sustenta lo determinado por el modelo de Monod.

Finalmente se puede concluir que el estudio cinético proporciona constantes de biodegradación del fluoreno tanto para las pruebas en reactor *batch* y RFA, siendo más factible desde un punto de vista económico y ambiental la implementación de reactores de biopelícula en la eliminación de compuestos aromáticos policíclicos; sin embargo, como se ha mencionado antes se deben de desarrollar estudios relacionados con el efecto del cambio de las concentraciones de los iones nitrato y nitrito ya que pueden afectar la biodegradación y la cantidad de especies presentes en el consorcio, además de realizar una caracterización de las especies que están presentes dentro del reactor.

Capítulo 6 Referencias

- [1] I. Mnif, S. Mnif, R. Sahnoun, S. Maktouf, Y. Ayedi, S. Ellouze-Chaabouni, and D. Ghribi, "Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 22, no. 19, pp. 14852–14861, 2015.
- [2] P. Ng, D. Heri, Y. Yanto, and S. Tachibana, "Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 85, pp. 438–450, 2013.
- [3] International Association of Oil & Gas Producers, "Oil spill preparedness and response: an introduction," 2015.
- [4] ITOPF, "Effects of Pollution on the Marine Environment," 13, 2013.
- [5] A. M. G. Cavazos-Arroyo, J. Beatriz Pérez Armendáriz, "Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México," *Agric. Soc. y Desarro.*, pp. 539–550, 2014.
- [6] P. M. Mexicanos, "Desempeño ambiental Pemex 2014," 2014.
- [7] "Derrame de Nuevo León fue de 400 Barriles de petroleo," *Expansion*, 2014. [Online]. Available: <http://expansion.mx/negocios/2014/08/25/derrame-en-nl-fue-de-4000-barriles>.
- [8] A. Ismail, M. Ekhwan, A. Kassim, S. Zain, M. Mokhtar, and M. Ayub, "Chemometric techniques in oil classification from oil spill fingerprinting," 2016.
- [9] D. R. W. Dr. Anne Marie Fouillac, Mr. Johannes Grath, *Groundwater Monitoring*. 2009.
- [10] Xueqin Wen Yali Yang Fangui Zeng Dongmei Huang, "Influence of Temperature and Airflow on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Simulated Self-combustion of Coal partings," *Environ. Chem. Eng.*, 2016.
- [11] J. Dong, Z. Cheng, and F. Li, "PAHs emission from the pyrolysis of Western Chinese coal," *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 104, pp. 502–507, 2013.
- [12] M. Afenyo, F. Khan, and B. Veitch, "A state-of-the-art review of fate and transport of oil spills in marine," *Ocean Eng.*, vol. 119, pp. 1–38, 2015.
- [13] xinfei Li, lin Zhao, and M. Adam, "Biodegradation of marine crude oil pollution using a salt-tolerant bacterial consortium isolated from Bohai Bay, China," *Mar. Pollut. Bull.*,

2016.

- [14] Y. Chen, B. Yu, J. Lin, R. Naidu, and Z. Chen, "Simultaneous adsorption and biodegradation (SAB) of diesel oil using immobilized *Acinetobacter venetianus* on porous material," *Chem. Eng. J.*, vol. 289, pp. 463–470, 2016.
- [15] T. Edwards, M. Colket, N. Cernansky, F. Dryer, F. Egolfopoulos, D. Friend, E. Law, D. Lenhert, P. Lindstedt, H. Pitsch, A. Sarofim, K. Seshadri, M. Smooke, W. Tsang, and S. Williams, "Development of an Experimental Database and Kinetic Models for Surrogate Jet Fuels," *45th AIAA Aerosp. Sci. Meet. Exhib.*, vol. 2007, no. 724, pp. 1–21, 2007.
- [16] S. N. Singh, B. Kumari, S. K. Upadhyay, S. Mishra, and D. Kumar, "Bacterial degradation of pyrene in minimal salt medium mediated by catechol dioxygenases: Enzyme purification and molecular size determination," *Bioresour. Technol.*, vol. 133, pp. 293–300, 2013.
- [17] D. Q. Wang, Y. X. Yu, X. Y. Zhang, S. H. Zhang, Y. P. Pang, X. L. Zhang, Z. Q. Yu, M. H. Wu, and J. M. Fu, "Polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in fish from Taihu Lake: Their levels, sources, and biomagnification," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 82, pp. 63–70, 2012.
- [18] J. Peiffer, F. Cosnier, N. Grova, H. Nunge, G. Salqu bre, M. J. Decret, B. Cossec, G. Rychen, B. M. R. Appenzeller, and H. Schroeder, "Neurobehavioral Toxicity of a Repeated Exposure (14 Days) to the Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Fluorene in Adult Wistar Male Rats," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, pp. 1–11, 2013.
- [19] R. A. Kristanti and T. Hadibarata, "Biodegradation and Identification of Transformation Products of Fluorene by Ascomycete Fungi," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 226, no. 12, pp. 1–6, 2015.
- [20] P. T. Williams, D. Bartie, and E. Andrews, "The relation compounds particulates between polycyclic aromatic in diesel fuels and exhaust," vol. 65, pp. 1150–1158, 1986.
- [21] S. N. D'yakov, A. V. Nevedrov, and A. V. Papin, "Fluorene production from coke-industry byproducts," *Coke Chem.*, vol. 55, no. 9, pp. 340–341, 2012.
- [22] Z. M. Lazim and T. Hadibarata, "Ligninolytic fungus *Polyporus* sp . S133 mediated metabolic degradation of fluorene," *Brazilian J. microbiology*, vol. BJM 92 1–7, pp.

1–7, 2016.

- [23] E. Nyankson, D. Rodene, and R. B. Gupta, “Advancements in Crude Oil Spill Remediation Research after the Deepwater Horizon Oil Spill,” *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 227, no. 1, 2016.
- [24] R. Srinivasan, Q. Lu, G. a Sorial, a D. Venosa, and J. Mullin, “Dispersant effectiveness of heavy fuel oils using baffled flask test,” *Environ. Eng. Sci.*, vol. 24, no. 9, pp. 1307–1320, 2007.
- [25] S. Rahsepar, M. P. J. Smit, A. J. Murk, H. H. M. Rijnaarts, and A. A. M. Langenhoff, “Chemical dispersants: a biodegradation friend or foe?,” *Chemosphere*, 2016.
- [26] L. Meng, H. Liu, M. Bao, and P. Sun, “Microbial community structure shifts are associated with temperature , dispersants and nutrients in crude oil-contaminated seawaters,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 111, pp. 203–212, 2016.
- [27] M. Seidel, S. Kleindienst, T. Dittmar, S. B. Joye, and P. M. Medeiros, “Biodegradation of crude oil and dispersants in deep seawater from the Gulf of Mexico : Insights from ultra-high resolution mass spectrometry,” *Deep. Res. II*, vol. 129, pp. 108–118, 2015.
- [28] H. Li, Y. Zhang, I. Kravchenko, H. Xu, and C. Zhang, “Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: a laboratory experiment.,” *J. Environ. Sci. (China)*, vol. 19, no. 8, pp. 1003–13, 2007.
- [29] G. Onur, F. Yilmaz, and B. Içgen, “Diesel Oil Degradation Potential of a Bacterium Inhabiting Petroleum Hydrocarbon Contaminated Surface Waters and Characterization of Its Emulsification Ability,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 18, no. 4, pp. 707–717, 2015.
- [30] F. Suja, F. Rahim, M. Raihan, N. Hambali, M. R. Razali, A. Khalid, and A. Hamzah, “Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and fi eld observations,” *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 90, pp. 115–122, 2014.
- [31] A. S. Roy, R. Baruah, M. Borah, A. K. Singh, H. P. Deka Boruah, N. Saikia, M. Deka, N. Dutta, and T. Chandra Bora, “Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 94, pp. 79–89, 2014.

- [32] E. Winqvist, K. Björklöf, E. Schultz, M. Räsänen, K. Salonen, K. T. Steffen, K. S. Jørgensen, F. Anasonye, and M. Tuomela, "Biodegradation Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi e From laboratory to fi eld scale," vol. 86, pp. 238–247, 2014.
- [33] J. A. Morlett-Chvez, J. A. Ascacio-Martinez, A. M. Rivas-Estilla, J. F. Velazquez-Vadillo, W. E. Haskins, H. A. Barrera-Saldara, and K. Acuna-Askar, "Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 64, no. 7, pp. 581–587, 2010.
- [34] E. Moliterni, R. G. Jimenez-Tusset, M. Villar Rayo, L. Rodriguez, F. J. Fernandez, and J. Villase??or, "Kinetics of biodegradation of diesel fuel by enriched microbial consortia from polluted soils," *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, vol. 9, no. 4, pp. 749–758, 2012.
- [35] Secretaria de Energia, "Aviso por el que se informa que a partir del 1 de abril de 2016, la Secretaría de Energía podrá otorgar permisos de importación de gasolinas y diésel a cualquier interesado que cumpla con las disposiciones jurídicas aplicables," *D. Of. la Fed.*, pp. 1–2, 2016.
- [36] J. Ma, L. Xu, and L. Jia, "Characterization of pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge," *Bioresour. Technol.*, vol. 140, pp. 15–21, 2013.
- [37] K. Acuna-Askar, D. E. Pecina-Chacon, M. Mas-Trevino, R. Tijerina-Menchaca, E. G. Rodriguez-Perez, H. A. Luna-Olvera, J. A. Ascacio-Martinez, H. A. Barrera-Saldana, and J. M. Alfaro-Barbosa, "The Monod and a biphasic biodegradation kinetics of diesel hydrocarbons by a biofilm of *Pseudomonas* and the potential electromotive force involved," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 90, no. 7, pp. 1253–1262, 2015.
- [38] J. R. B. Theodore L. Brown, H. Eugene LeMay, Bruce E. Bursten, *Química la Ciencia Central*, Novena Edi. 2004.
- [39] E. Cortés Marín, H. Suarez Mahecha, and S. Pardo Carrasco, "Biocombustibles Y Autosuficiencia Energética Bio-Fuels and Energy Self-Sufficiency," *Dyna*, vol. 76, pp. 101–110, 2009.

- [40] C. Cardona, "Perspectives of Biofuels Production in Colombia : Latinamerican and World Contexts," *Rev. Ing. Univ. los Andes*, vol. 29, pp. 109–120, 2009.
- [41] C. L. Carlos Razo, Sofia Astete-Miller, Alberto Sucedo, "Biocombustibles y su impacto potencial en la estructura agraria, precios y empleo en América Latina," 2007.
- [42] H. Campodónico Sánchez, "La industria del gas natural y su regulación en América Latina," *Rev. la CEPAL*, 1999.
- [43] J. H. Estrada, "DESARROLLO DEL GAS LUTITA (SHALE GAS) Y SU IMPACTO EN EL MERCADO ENERGÉTICO DE MÉXICO: REFLEXIONES PARA CENTROAMÉRICA," *CEPAL Nac. UNIDAS*, vol. 32, pp. 1–119, 2013.
- [44] N. Corona-Esquivel, Rodolfo; Tritlla, Jordi; Benavides-Muñoz, María Elena; Piedad-Sánchez, "Geología, estructura y composición de los principales yacimientos de carbón mineral en México Boletín," *Redalyc*, vol. LVIII, pp. 141–160, 2006.
- [45] C. G. de Minería, "Perfil General del Carbón," *Dir. Gen. Desarro. Min.*, 2014.
- [46] IMP, "Instituto Mexicano del Petróleo," *Composicion del petróleo*, 2016. [Online]. Available: <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=comp>.
- [47] "Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP)," 2016.
- [48] Naciones Unidas, "Convención marco sobre el cambio climático," vol. 21930, p. 40, 2015.
- [49] H. K. Bojes and P. G. Pope, "Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 47, no. 3, pp. 288–295, 2007.
- [50] SEMARNAT, "NOM-138-SEMARNAT-SSA1-2012," *D. ofical la Fed.*, vol. Lunes 28 d, no. Lunes 28 de Abril de 2014, p. 83, 2012.
- [51] J. G. HERNÁNDEZ., "Atención de derrames de petróleo crudo en el Golfo de México," UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, 2014.
- [52] P. M. Mexicanos, "Anuario Estadístico Pemex 2014," 2014.
- [53] C. N. de Hidrocarburos, "Indicadores Anuales Reporte de Fugas de Gas Natural al

Primer Semestre de 2014 Indicadores Anuales,” pp. 2–3, 2014.

- [54] E. García-lópez and J. Z. D. J. Palma-lópez, “Characterization of Plant Communities in an Area Affected by Hydrocarbon Spill,” *Terra Latinoam.*, vol. 24, pp. 17–26, 2006.
- [55] J. Zavala-Cruz, F. Gavi-Reyes, Adams-Schroeder Randy Howard, Ferrera-Cerrato, Ronald, D. J. Palma-López, and J. M. Vaquera-Huerta, Humberto Domínguez-Ezquivel, “DERRAMES DE PETRÓLEO EN SUELOS Y ADAPTACIÓN DE PASTOS TROPICALES EN EL ACTIVO CINCO PRESIDENTES, TABASCO, MÉXICO,” *Terra Latinoam.*, vol. 23, pp. 293–302, 2005.
- [56] F. García-Cuéllar, J., Arreguín-Sánchez and L.-C. D. Hernández-Vázquez, S., “IMPACTO ECOLÓGICO DE LA INDUSTRIA PETROLERA EN LA SONDA DE CAMPECHE, MÉXICO, TRAS TRES DÉCADAS DE ACTIVIDAD: UNA REVISIÓN,” *Interciencia*, vol. 29, pp. 311–319, 2004.
- [57] D. Soto, L.A., Sánchez-García, S., López-Veneroni, “Environments influenced by natural sites of gas and fossil hydrocarbon seeps in the SW Gulf of Mexico,” *Univ. y Cienc.*, vol. Número esp, pp. 51–58, 2004.
- [58] W. Sangabriel, R. Ferrera-cerrato, D. Trejo-aguilar, M. R. Mendoza-lópez, J. S. Cruz-sánchez, C. López-ortiz, J. Delgadillo-martínez, and A. Alarcón, “TOLERANCIA Y CAPACIDAD DE FITORREMEDIACIÓN DE COMBUSTÓLEO EN EL SUELO POR SEIS ESPECIES VEGETALES,” vol. 22, no. 2, pp. 63–73, 2006.
- [59] E. J. Olguín, M. Elizabeth, U. De Biotecnología, A. Instituto, and a C. Inecol, “CONTAMINACIÓN DE MANGLARES POR HIDROCARBUROS Y ESTRATEGIAS DE BIORREMEDIACIÓN, FITORREMEDIACIÓN Y RESTAURACIÓN,” vol. 23, no. 1, pp. 139–154, 2007.
- [60] A. L. Juhasz and R. Naidu, “Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene,” *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 45, pp. 57–88, 2000.
- [61] F. S. Lang, J. Destain, F. Delvigne, P. Druart, M. Ongena, and P. Thonart, “Characterization and Evaluation of the Potential of a Diesel-Degrading Bacterial Consortium Isolated from Fresh Mangrove Sediment,” *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 227,

no. 2, p. 58, 2016.

- [62] Zulfiqar Ali Malik, "Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium," *African J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 3, pp. 650–658, 2012.
- [63] D. E. C. Mazzeo, C. E. Levy, D. de F. de Angelis, and M. A. Marin-Morales, "BTEx biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery," *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 20, pp. 4334–4340, 2010.
- [64] K. Ravindra, R. Sokhi, and R. Van Grieken, "Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation," *Atmos. Environ.*, vol. 42, no. 13, pp. 2895–2921, 2008.
- [65] J. Zhang, G. Liu, Z. Yuan, and R. Wang, "Levels and distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in middle reach of Huaihe River, China: anthropogenic influences and ecological risks," *Nat. Hazards*, vol. 74, no. 2, pp. 705–716, 2014.
- [66] C. . Cerniglia, "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons," *Biodegradation*, vol. 3, pp. 351–368, 1996.
- [67] L. B. Pavlovich, N. V. Zhuravleva, and D. V. Bal'tser, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in coke-plant wastewater," *Coke Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 390–395, 2010.
- [68] U. S. department of H. and H. services Agency for Toxic Substances and Disease Registry, "Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Environ. Protection Agency*, no. 9, pp. 1–68, 2012.
- [69] J. S. Seo, Y. S. Keum, and Q. X. Li, *Bacterial degradation of aromatic compounds*, vol. 6, no. 1. 2009.
- [70] Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. department of Health and Human services, "Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," no. August, 1995.
- [71] J. M. Al-Hassan, M. Afzal, C. V. N. Rao, and S. Fayad, "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and aliphatic hydrocarbons (AHs) in edible fish from the Arabian gulf," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 70, no. 2, pp. 205–212, 2003.
- [72] M. J. Suess, "The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons,"

Sci. Total Environ., vol. 6, no. 3, pp. 239–250, 1976.

- [73] J. C. White and T. Triplett, "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments and fish of the Mill River, New Haven, Connecticut, USA," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 68, no. 1, pp. 104–110, 2002.
- [74] S. Froehner, M. MacEne, E. C. Da Luz, D. B. Souza, and K. S. MacHado, "Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments and their potential toxic effects," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 168, no. 1–4, pp. 205–213, 2010.
- [75] B. Chen, J. Huang, K. Yuan, L. Lin, X. Wang, L. Yang, and T. Luan, "Direct evidences on bacterial growth pattern regulating pyrene degradation pathway and genotypic dioxygenase expression," *Mpb*, vol. 105, pp. 73–80, 2016.
- [76] H. P. Bacosa and C. Inoue, "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan," *J. Hazard. Mater.*, vol. 283, pp. 689–697, 2015.
- [77] M. G. Waigi, F. Kang, C. Goikavi, W. Ling, and Y. Gao, "Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 104, pp. 333–349, 2015.
- [78] G. Zafra and D. V. Cortés-Espinosa, "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 22, no. 24, pp. 19426–19433, 2015.
- [79] a Mrozik and P, "Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Polish J. Environ. Stud.*, vol. 12, no. 1, pp. 15–25, 2003.
- [80] S. Harayama, "Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design," *Curr. Opin. Biotechnol.*, pp. 268–273, 1997.
- [81] E. Wi??niowska and M. Janosz-Rajczyk, "Selected PAHs concentration changes under nitrate and sulphate reducing conditions," *Desalination*, vol. 211, no. 1–3, pp. 232–237, 2007.
- [82] L. P. Wilson and E. J. Bouwer, "Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review.," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18, pp. 116–

130, 1997.

- [83] V. Stewart, "Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 66, pp. 37–45, 1994.
- [84] W. Reineke, "Aerobic and Anaerobic Biodegradation Potentials," in *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 2 Part K Biodegradation and Persistence*, vol. 2, 2001, pp. 1–161.
- [85] R. Pierre Caumette, Jean-claude Bertrand, Philippe Lebaron and Matheron, *Environmental Microbiology : Fundamentals and Applications*. 2011.
- [86] R. B. Ronald M. Atlas, *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*, Cuarta Edi. 2008.
- [87] B. V. Chang, I. T. Chang, and S. Y. Yuan, "Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 80, no. 2, pp. 145–149, 2008.
- [88] D. Okutman Tas and S. G. Pavlostathis, "Microbial transformation of pentachloronitrobenzene under nitrate reducing conditions," *Biodegradation*, vol. 21, no. 5, pp. 691–702, 2010.
- [89] B. V. Chang, J. S. Chang, and S. Y. Yuan, "Degradation of phenanthrene in river sediment under nitrate-reducing conditions," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 67, no. 6, pp. 898–905, 2001.
- [90] X. Yang, J. Ye, L. Lyu, Q. Wu, and R. Zhang, "Anaerobic biodegradation of pyrene by *paracoccus denitrificans* under various nitrate/nitrite-reducing conditions," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 224, no. 5, 2013.
- [91] J. W. Moir and N. J. Wood, "Nitrate and nitrite transport in bacteria," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 2, pp. 215–224, 2001.
- [92] X. Huang, J. Yang, W. Zhang, Z. Zhang, and Z. An, "Determination of the Critical Micelle Concentration of Cationic Surfactants An Undergraduate Experiment," vol. 76, no. 1, pp. 93–94, 1999.
- [93] M. J. L. Castro, J. Kovensky, Hernan Ritacco, and A. Fernández-cirelli, "A Simplified Method for the Determination of Critical Micelle Concentration," *J. Chem. Educ.*, vol. 78,

no. 3, pp. 347–348, 2001.

- [94] J. Nasimul Gani, Khanam, “Are Surfactant Molecules Really Oriented in the Interface ?,” *J. Chem. Educ.*, vol. 79, no. 3, pp. 332–333, 2002.
- [95] D. A. Edwards, R. G. Luthy, and Z. Liu, “Solubilization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Micellar Nonionic Surfactant Solutions,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 25, no. 1, pp. 127–133, 1991.
- [96] A. A. Dar, G. M. Rather, and A. R. Das, “Mixed Micelle Formation and Solubilization Behavior toward Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of Binary and Ternary Cationic - Nonionic Surfactant Mixtures,” *J. phys. Chem. B.*, vol. 111, no. 91, pp. 3122–3132, 2007.
- [97] J. Wei, G. Huang, J. Li, and X. Wang, “A Promising Surfactant for Enhanced Sorption and Desorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2016.
- [98] P. L. Bishop, T. C. Zhang, and Y. Fu, “Effects of biofilm structure, microbial distributions and mass transport on biodegradation processes,” *Pergamon*, vol. 31, no. 1, 1995.
- [99] F. L. Hellweger, “75 years since Monod: It is time to increase the complexity of our predictive ecosystem models (opinion),” *Ecol. Modell.*, vol. 346, pp. 77–87, 2017.
- [100] N. Strigul, H. Dette, and V. B. Melas, “A practical guide for optimal designs of experiments in the Monod model,” *Environ. Model. Softw.*, vol. 24, no. 9, pp. 1019–1026, 2009.
- [101] D. E. G. Trigueros, A. N. Módenes, A. D. Kroumov, and F. R. Espinoza-Quiñones, “Modeling of biodegradation process of BTEX compounds: Kinetic parameters estimation by using Particle Swarm Global Optimizer,” *Process Biochem.*, vol. 45, no. 8, pp. 1355–1361, 2010.
- [102] M. Campos-Pineda, K. Acuna-Askar, J. A. Martinez-Guel, M. Mas-Trevino, R. Tijerina-Menchaca, L. M. Martinez, M. Videa, and R. Parra-Saldivar, “Time and cost efficient biodegradation of diesel in a continuous-upflow packed bed biofilm reactor and effect of surfactant GAELE,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 8, pp. 1131–1140, 2012.
- [103] K. Acuna-Askar, J. F. Villarreal-Chiu, M. V. Gracia-Lozano, M. T. Garza-Gonzalez, B. Chavez-Gomez, I. P. Rodriguez-Sanchez, and H. A. Barrera-Saldana, “BTE-OX

- biodegradation kinetics with MTBE through bioaugmentation,” *Water Sci. Technol.*, vol. 50, no. 5, pp. 85–92, 2004.
- [104] E. Arvin, “Biodegradation kinetics of chlorinated aliphatic hydrocarbons with methane oxidizing bacteria in an aerobic fixed biofilm reactor,” *Water Res.*, vol. 25, no. 7, pp. 873–881, 1991.
- [105] S. Gupta, B. Pathak, and M. H. Fulekar, “Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review,” *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 14, no. 2, pp. 241–269, 2015.
- [106] E. Loupasaki and E. Diamadopoulos, “Attached growth systems for wastewater treatment in small and rural communities: A review,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 88, no. 2, pp. 190–204, 2013.
- [107] Y. Jo, J. Kim, S. Hwang, and C. Lee, “Anaerobic treatment of rice winery wastewater in an upflow filter packed with steel slag under different hydraulic loading conditions,” *Bioresour. Technol.*, vol. 193, pp. 53–61, 2015.
- [108] Y. Wang, R. Riess, M. Nemati, G. Hill, and J. Headley, “Scale-up impacts on mass transfer and bioremediation of suspended naphthalene particles in bead mill bioreactors,” *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 17, pp. 8143–8150, 2008.
- [109] Q. Niu, T. Kobayashi, Y. Takemura, K. Kubota, and Y. Y. Li, “Evaluation of functional microbial community’s difference in full-scale and lab-scale anaerobic digesters feeding with different organic solid waste: Effects of substrate and operation factors,” *Bioresour. Technol.*, vol. 193, pp. 110–118, 2015.
- [110] W. Qin, Y. Zhu, F. Fan, Y. Wang, X. Liu, A. Ding, and J. Dou, “Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: Degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 121, pp. 131–138, 2017.
- [111] M. A. Demeter, J. A. Lemire, S. M. Mercer, and R. J. Turner, “Screening selectively harnessed environmental microbial communities for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in moving bed biofilm reactors,” *Bioresour. Technol.*, vol. 228, pp. 116–124, 2017.

- [112] C. S. Criddle, J. T. DeWitt, D. Grbic-Galic, and P. L. McCarty, "Transformation of carbon tetrachloride by *Pseudomonas* sp. strain KC under denitrification conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, no. 11, pp. 3240–3246, 1990.
- [113] S. Aldrich, *Nitrate Reduction Test Fluka*, vol. 1. 2017, pp. 755–757.
- [114] Water Environment Federation (WEF)., "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2540 E," no. 1, pp. 1–6, 1998.
- [115] J. Lee, S. Lee, S. Yu, and D. Rhew, "Relationships between water quality parameters in rivers and lakes: BOD5, COD, NBOPs, and TOC," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 188, no. 4, pp. 1–8, 2016.
- [116] A. Manoharan, V. Gangal, S. D. Makhijani, A. Sharma, A. Kumar, and R. Kumar, "Validation of the use of microbial consortium as standard seeding material in BOD determination," *Hydrobiologia*, no. 1979, pp. 77–86, 2000.
- [117] P. a Gwaski, S. S. Hati, N. P. Ndahi, and V. O. Ogugbuaja, "Modeling Parameters of Oxygen Demand in the Aquatic Environment of Lake Chad for Depletion Estimation," *ARPJ J. Sci. Technol.*, vol. 3, no. 1, pp. 116–123, 2013.
- [118] SEMARNAT, "Normas Oficiales Mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 NOM-002-SEMARNAT-1996 NOM-003-SEMARNAT-1997," *Conagua*, pp. 1–65, 2013.
- [119] D. T. Sponza and O. Gök, "Effect of rhamnolipid on the aerobic removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and COD components from petrochemical wastewater," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 3, pp. 914–924, 2010.
- [120] U. 20th edn, American Water, Public Health Association/American Environment, Works Association/Water Federation, Washington, DC, *Standard Methods for Of, the Examination Wastewater., Water and Wastewater*. 1998.
- [121] J. Wei, G. Huang, C. An, and H. Yu, "Investigation on the solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of single and mixed Gemini surfactants," *J. Hazard. Mater.*, vol. 190, no. 1–3, pp. 840–847, 2011.
- [122] P. S. Sales, R. H. de Rossi, and M. A. Fernández, "Different behaviours in the solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in water induced by mixed surfactant

solutions,” *Chemosphere*, vol. 84, no. 11, pp. 1700–1707, 2011.

- [123] D. Nagaiah, T. Chiranjeevi, P. Srinivas Rao, A. Uma, and R. S. Prakasham, “Fermentation of Pretreated High-Biomass Sorghum Hydrolysates to Biohydrogen by Mixed Consortia,” *Sugar Tech*, vol. 18, no. 3, pp. 266–272, 2016.
- [124] M. Shahriari Moghadam, G. Ebrahimipour, B. Abtahi, A. Ghassempour, and M. S. Hashtroudi, “Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments,” *J. Environ. Heal. Sci. Eng.*, vol. 12, no. 1, p. 114, 2014.
- [125] M. Kumar, W. C. Liao, J. C. Tsai, and J. G. Lin, “Versatility of fluorene metabolite (phenol) in fluorene biodegradation by a sulfate reducing culture,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 65, no. 3, pp. 522–526, 2011.
- [126] J. C. Tsai, M. Kumar, and J. G. Lin, “Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 164, no. 2–3, pp. 847–855, 2009.
- [127] J. Dou, X. Liu, and A. Ding, “Anaerobic degradation of naphthalene by the mixed bacteria under nitrate reducing conditions,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 165, no. 1–3, pp. 325–331, 2009.
- [128] K. J. Rockne and S. E. Strand, “Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture,” *Water Res.*, vol. 35, no. 1, pp. 291–299, 2001.
- [129] S. E. Strand, “Biodegradation of Bicyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Anaerobic Enrichments,” *Environmental Sci. Technol.*, vol. 32, no. 24, pp. 3962–3967, 1998.
- [130] O. O. Alegbeleye, B. O. Opeolu, and V. Jackson, “Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa,” *Brazilian J. Microbiol.*, pp. 1–12, 2016.
- [131] E. Wisniowska and M. Janosz-Rajczyk, “Selected PAHs concentration changes under nitrate and sulphate reducing conditions,” *Desalination*, vol. 211, no. 1–3, pp. 232–237,

2007.

- [132] A. S. Oberoi, L. Philip, and S. M. Bhallamudi, "Biodegradation of Various Aromatic Compounds by Enriched Bacterial Cultures: Part A-Monocyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 176, no. 7, pp. 1870–1888, 2015.
- [133] C. H. Li, Y. S. Wong, and N. F. Y. Tam, "Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with amendment of iron(III) in mangrove sediment slurry," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 21, pp. 8083–8092, 2010.
- [134] H. Il Park, D. K. Kim, Y. J. Choi, and D. Pak, "Nitrate reduction using an electrode as direct electron donor in a biofilm-electrode reactor," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 10, pp. 3383–3388, 2005.
- [135] P. Bishop, "Biofilm structure and kinetics," *Water Sci. Technol.*, vol. 36, no. 1, pp. 287–294, 1997.
- [136] G. Ji, B. Liao, H. Tao, and Z. Lei, "Analysis of bacteria communities in an up-flow fixed-bed (UFB) bioreactor for treating sulfide in hydrocarbon wastewater," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 21, pp. 5056–5062, 2009.